

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

BIOENERGETICS

AN INTRODUCTION TO THE CHEMIOSMOTIC THEORY

David G. Nicholls

Neurochemistry Laboratory
Department of Psychiatry
Ninewells Medical School
University of Dundee
Dundee
Scotland

1982
Academic Press
A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich,
Publishers

London New York
Paris San Diego San Francisco
Sao Paulo Sydney Tokyo Toronto

ДЭВИД
ДЖ.
НИКОЛС

БИОЭНЕРГЕТИКА

ВВЕДЕНИЕ В ХЕМИОСМОТИЧЕСКУЮ ТЕОРИЮ

Перевод с английского
канд. биол. наук Б. В. Черняка
под редакцией
д-ра биол. наук И. А. Козлова

Москва «Мир» 1985

ББК 28.07
Н 63
УДК 577.1:547.9

Николс Д.

Н 63 Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию: Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 190 с., ил.

Книга известного английского биохимика посвящена хемиосмотической теории, создатель которой П. Митчелл был удостоен в 1978 г. Нобелевской премии. Рассмотрены принципы энергетических превращений, происходящих в биологических мембранах, дана краткая характеристика клеточных структур (митохондрий, хлоропластов) и бактерий, в мембранах которых осуществляется транспорт ионов и различных биологических молекул.

Предназначена для биохимиков, биофизиков, молекулярных биологов, для студентов-биологов.

Н 2007020000—039
041(01)—85 000—85, св. пл., 1985

ББК 28.07
57.04

Редакция литературы по биологии

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Биоэнергетика изучает молекулярные механизмы потребления энергии живой клеткой, а также механизмы преобразования этой энергии в форму, которая может быть использована для совершения различных видов полезной работы (биосинтез, транспорт веществ против градиентов их концентраций, мышечное сокращение, движение клеток, теплопродукция и т. д.). Другими словами, биоэнергетика — это наука о «судьбе» энергии в клетке. Солнечный свет, которому мы обязаны самим существованием жизни, служит первоначальным источником энергии для растений и фотосинтезирующих бактерий. Энергетические аспекты фотосинтеза — важная составляющая часть биоэнергетической науки. Окисление органических веществ кислородом воздуха — другой универсальный механизм потребления энергии внешней среды живыми организмами. Дыхание и фотосинтетические процессы протекают на мембранах, отличительная черта которых состоит в их крайне низкой проницаемости для ионов водорода. Энергия, улавливаемая при поглощении света растениями и фотосинтезирующими бактериями или выделяемая при окислении органических соединений дышащими организмами, запасается в конечном итоге в химической форме, в виде АТФ. Это сравнительно простое (по биологическим масштабам) химическое соединение служит универсальной энергетической «валютой» живой клетки. Изучение молекулярного механизма образования АТФ на биологических мембранах является основным предметом биоэнергетики.

Д. Николс — известный в кругах биоэнергетиков человек. Его исследования по механизму теплопродукции в тканях бурого жира — блестящий пример решения биоэнергетиком важной общепрограммной проблемы. Однако в авторе книги «Биоэнергетика: введение в хемиосмотическую теорию» угадывается не только крупный ученый, но и опытный педагог. Это и не удивительно: Николс в течение многих лет преподает биоэнергетику в университете в шотландском городе Данди. По-видимому, именно Николс-преподаватель сумел так строго логично и лаконично изложить материал. Впрочем, Николс-ученый не остается равнодушным созерцателем лаконичного изложения проверенных фактов. Предложенная им в гл. 7 схема работы АТФ-синтетазы вряд ли имеет достаточно строгое обоснование, чтобы уже сейчас «войти в учебники». Однако я не сомневаюсь в том, что эта модель АТФ-синтетазы, как и некоторые другие дискуссионные части книги, вызовут интерес у читателя, независимо от того, будет ли этот читатель студентом-биохимиком, или исследователем, имеющим большой стаж работы в области биоэнергетики.

В предисловии своей книги Николс пишет, что она предполагает у читателя знание университетского курса биохимии. С моей точки зрения, круг читателей этой книги может быть значительно шире. Книга будет интересна и полезна не только для студентов старших курсов, аспирантов биологических специальностей и исследователей-биохимиков, но также для всех тех, кто имеет естественно-научное образование и хочет узнать, что представляет собой биоэнергетическая наука.

И. А. Козлов

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биоэнергетика как отдельная отрасль биохимии существует вот уже 30 лет. Благодаря появлению хемиосмотической гипотезы Митчелла удалось в значительной степени упорядочить знания в этой области. Однако до сих пор как студентам, так и биохимикам — не специалистам в области биоэнергетики — очень трудно ориентироваться в текущей литературе. В большой мере это связано с разрывом, существующим между учебниками по общей биохимии, в которых многие вопросы рассматриваются поверхностно, и текущими статьями, которые обычно посвящены частным вопросам, нередко противоречат друг другу, а иногда просто непонятны.

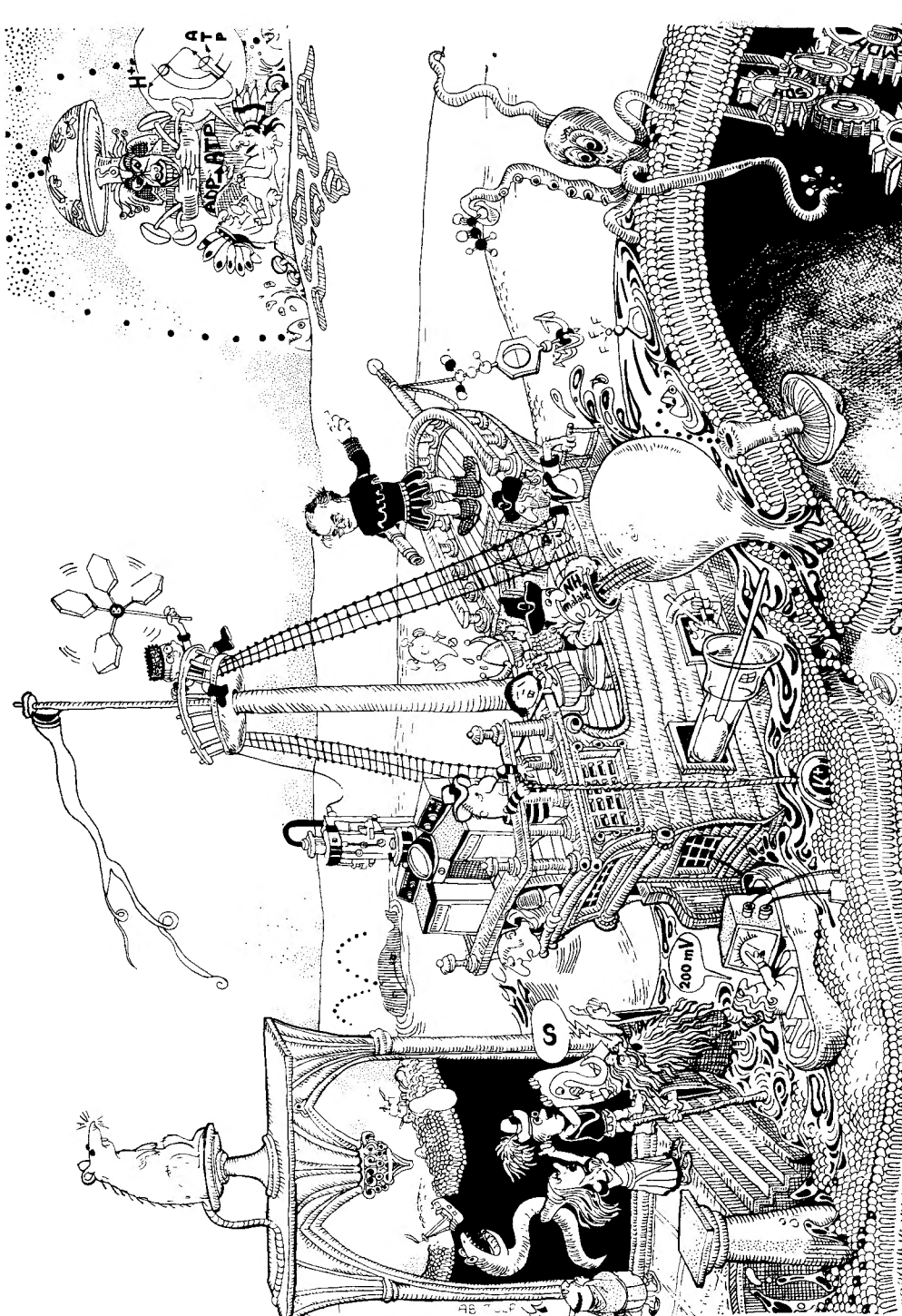
Задача этой книги — дать введение в биоэнергетику, а не обзор последних достижений в этой области. Поэтому, во-первых, несмотря на то, что практически по каждой из рассмотренных тем в литературе существуют различные точки зрения, я буду исходить из тех представлений, которые, как мне кажется, принимаются сейчас большинством исследователей. Так, в частности, отправной точкой для изложения будет служить «основной постулат» хемиосмотической гипотезы: энергетическое сопряжение осуществляется через электрохимический градиент протонов. Во-вторых, при цитировании я ограничился наиболее доступными обзорами и очень небольшим числом оригинальных работ, которые служат лишь для иллюстрации. Эти обзоры содержат полную биоэнергетическую библиографию и позволяют значительно сократить объем книги. Я надеюсь, коллеги примут во внимание, что отбор цитируемых оригинальных работ ни в коей мере не отражает научный приоритет.

Книга рассчитана на общий уровень знаний по биохимии, эквивалентный содержанию современных учебников по общей биохимии для студентов. Таким образом, она предназначена для студентов старших курсов, аспирантов и исследователей — не специалистов в данной области.

Выражаю свою благодарность Абрахаму Талпу и ТАВ за рисунки. Рисунки, предшествующие гл. 2, 4—7, приводятся с разрешения журнала «Trends in Biochemical Sciences».

Данди, сентябрь 1981

Дэвид Дж. Николс



Глава 1

ХЕМИОСМОТИЧЕСКИЙ ПРИНЦИП ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ

1.1. ЧТО ТАКОЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ?

Все биохимические реакции сопровождаются изменениями энергии, так что термин «биоэнергетика» можно применить ко всей биохимии. Однако исследователи, занимающиеся биоэнергетикой, ограничивают поле своей деятельности процессами определенных типов, происходящими в мембранах некоторых классов. Центральной проблемой биоэнергетики на протяжении последних 30 лет было выяснение механизма, с помощью которого энергия, освобождаемая при окислении субстратов или при поглощении света, может использоваться для катализа энергозависимых процессов, таких, как синтез АТФ из АДФ и P_i или перенос ионов через мембрану против градиента их концентрации.

Хотя синтез АТФ частично происходит и в растворимых ферментных системах, все же большая часть АТФ образуется в ферментных комплексах, расположенных в мембранах определенных классов. К таким «сопрягающим» мембранам относятся плазматическая мембрана прокариотических клеток (бактерий и сине-зеленых водорослей), внутренняя мембрана митохондрий и мембрана тилакоидов хлоропластов (рис. 1.1). Механизмы синтеза АТФ и транспорта ионов в этих мембранах весьма близки, несмотря на различную природу первичных источников энергии. Это позволяет выделить изучение этих механизмов в отдельную область, названную *энергетическое сопряжение* или *биоэнергетика*.

Сопрягающие мембраны имеют целый ряд отличительных черт. Каждая такая мембрана содержит белковые ансамбли двух типов. Один из них обычно называют АТФазой, хотя более правильным было бы название АТФ-синтетаза, так как он катализирует энергозависимый синтез АТФ из АДФ и P_i . Этот комплекс присутствует во всех сопрягающих мембранах. Природа второго белкового ансамбля зависит от первичного источника энергии, используемого в данной мембране. В случае митохондрий и дышащих бактерий — это дыхательная цепь, катализирующая перенос электронов от субстратов к конечным акцепторам, таким, как O_2 . В хлоропластах и фотосинтезирующих бактериях сходная система обеспечивает использование энергии поглощенного кванта видимого света (рис. 1.1).

Митчелл пускается в плавание к берегам Нового Хемиосмотического Света, невзирая на бесчисленные трудности, которые ждут его на пути.

А. Внутренняя мембрана митохондрий

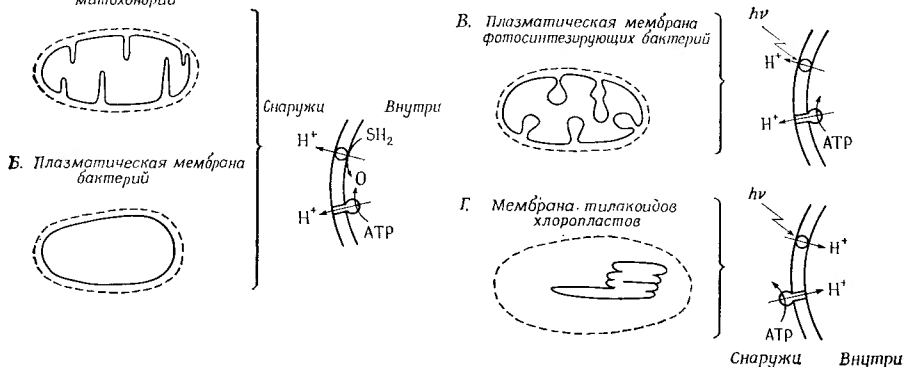


Рис. 1.1. Сопрягающие мембраны.

Поиск «энергетического интермедиата», связывающего эти две системы, оказался чрезвычайно сложной проблемой. Многолетние попытки найти высокоэнергетическое химическое соединение, сопрягающее окисление с синтезом АТФ, не дали успеха. Была достигнута та стадия полной неясности, когда можно было смело утверждать, что «тот, кто еще не полностью запутался, просто не понимает, в чем состоит проблема». Именно в этот момент на сцене появился Питер Митчелл со своей хемиосмотической гипотезой (1961), в которой утверждалось, что единственным «интермедиатом» служит градиент протонов на мембране. Последующие, часто весьма острые дебаты между сторонниками химической, хемиосмотической и других гипотез продолжались не ослабевая в течение 15 лет (Boyer et al., 1977). Хемиосмотическая гипотеза была подвергнута самой тщательной проверке, пожалуй, более тщательной, чем любая другая биохимическая теория. Постепенно новообращенных сторонников гипотезы становилось все больше, а Питеру Митчеллу была присуждена Нобелевская премия по химии за 1978 г. (Garland, 1978; Chappell, 1979).

1.2. ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА

(Обзоры: Mitchell, 1961, 1966, 1968, 1979a, Greville, 1969).

Центральный постулат хемиосмотической гипотезы гласит, что электронпереносящие цепи митохондрий, хлоропластов и бактерий сопряжены с системой синтеза АТФ через разность электрохимических потенциалов протонов ($\Delta\mu_{H^+}$) на сопрягающих мембранах. Электрохимический потенциал протонов слу-

жит термодинамической мерой того, насколько градиент протонов через мембрану далек от равновесия (это будет обсуждаться далее, см. разд. 3.4). Перенос электронов и синтез АТФ сопряжены с работой двух различных обратимых протонных помп. При переносе электронов образуется разность потенциалов $\Delta\mu_{H^+}$, которая затем используется для обращения протонной помпы, гидролизующей АТФ (АТФ-синтетазы), т. е. для синтеза АТФ.

Таким образом, всякая сопрягающая мембрана содержит две протонные помпы. Движущей силой для одной из них служит перенос электронов или поглощение фотонов, а для другой — гидролиз АТФ (рис. 1.1). Обе помпы ориентированы в мембране одинаково: перенос электронов по цепи (от высокопотенциальных доноров к акцепторам) и гидролиз АТФ АТФ-синтетазой приводят к трансмембранному переносу протонов в одном направлении (рис. 1.1). И в том и в другом случае перенос протонов через мембрану тесно связан с переносом электронов или гидролизом АТФ.

На рис. 1.2 показано, как такие помпы могут быть использованы для непрерывного синтеза АТФ. Если создать условия, в которых активна лишь АТФ-синтетаза, и добавить к органеллам АТФ, то гидролиз АТФ и перенос протонов будут происходить до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие между энергией, освобожденной

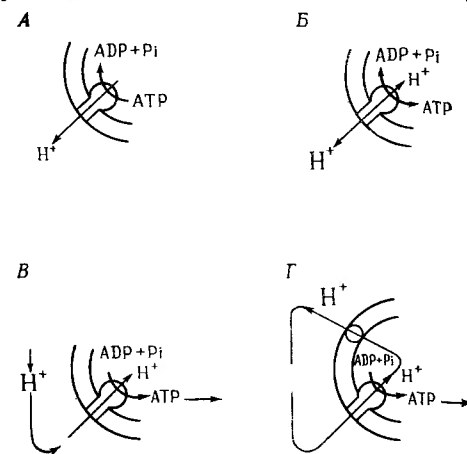


Рис. 1.2. Протонное электрохимическое сопряжение. А. АТФ гидролизуется, $\Delta\mu_{H^+}$ генерируется. Б. Равновесие. В. $\Delta\mu_{H^+}$ поддерживается извне, АТФ синтезируется. Г. Величина $\Delta\mu_{H^+}$ поддерживается постоянной благодаря работе второй протонной помпы.

цитозоле, а высокий уровень $\Delta\mu_{H^+}$ поддерживается за счет работы дыхательной или фотосинтетической электронпереносящей цепи (рис. 1.2, Г).

В результате работы протонных насосов устанавливается круговой ток протонов через сопрягающую мембрану (рис. 1.3).

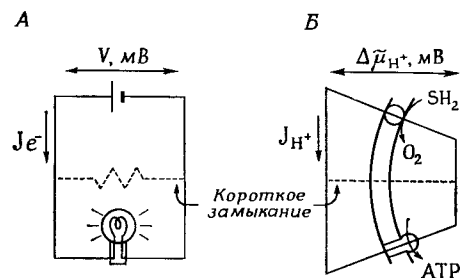


Рис. 1.3. Аналогия между электрической цепью (А) и протонным циклом (Б). В обоих случаях имеются генераторы потенциала (батарея и дыхательная цепь), а также потенциал (разность электрических потенциалов и разность электрохимических потенциалов протонов), который измеряется в вольтах или милливольтх. И в том и в другом случае потенциал можно использовать для совершения работы (свет лампы и синтез АТФ). Обе цепи могут быть замкнуты накоротко. Скорости химических реакций как в батарее, так и в дыхательной цепи тесно связаны с током электронов и протонов в остальной части цепи, а он в свою очередь зависит от сопротивления в этой части цепи. При увеличении тока потенциал в обеих цепях падает.

Этот ток весьма сходен с током в электрической цепи, причем такую аналогию можно продолжить даже при обсуждении деталей сложных энергетических процессов (гл. 4). Как и в случае электрической цепи, может быть определена разность потенциалов (уже введенная нами $\Delta\mu_{H^+}$), протонный ток (J_{H^+}) и протонная проводимость (S_{mH^+}), равная отношению тока, протекающего через данный компонент, к падению потенциала на нем. В последующих главах мы будем часто пользоваться этими параметрами.

Ясно, что для того, чтобы не произошло короткого замыкания, мембрана должна быть замкнутой и должна иметь высокое сопротивление для протонов. Одно из наиболее успешных предсказаний хемиосмотической гипотезы состоит в том, что многие агенты, разобщающие окисление и синтез АТФ, действуют именно путем повышения протонной проводимости мембран и вызывают короткое замыкание (рис. 1.3). Для того чтобы в рамках хемиосмотической гипотезы объяснить перенос отрицательно заряженных метаболитов во внутреннее пространство митохондрии (также заряженное отрицательно), Митчелл предположил существование транспортных систем, переносящих та-

кие метаболиты в нейтральной форме в комплексе с протонами или в обмен на ионы OH^- (Mitchell, 1961, 1966).

Существует определенная семантическая трудность при выборе между выражениями «хемиосмотическая гипотеза» и «теория Митчелла». В этой книге термин «хемиосмос» используется как синоним приведенного выше основного постулата, согласно которому сопряжение осуществляется через протонный градиент. Существует множество вторичных гипотез, принадлежащих Питеру Митчеллу и другим исследователям, в которых рассматриваются детальные молекулярные механизмы работы протонных насосов, однако следует подчеркнуть, что справедливость основного постулата не зависит от того, верны ли эти гипотезы.

1.3. СОПРЯГАЮЩИЕ ОРГАНЕЛЛЫ

1.3.1. МИТОХОНДРИИ И СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ЧАСТИЦЫ

[Обзоры: Nedergaard, Cannon, 1979 (выделение); Munn, 1974 (морфология); Harmon et al., 1974; De Pierre, Ernster, 1977 (локализация ферментов)].

Схематическое изображение тонкого среза через митохондрию приведено на рис. 1.4. Митохондрии обычно имеют длину 0,7—1 мкм. Их форма непостоянна и в клетке может меняться. Форма крист в митохондриях, выделенных из различных тканей, также сильно различается, причем это относится даже к одним и тем же митохондриям, суспендированным в различных средах.

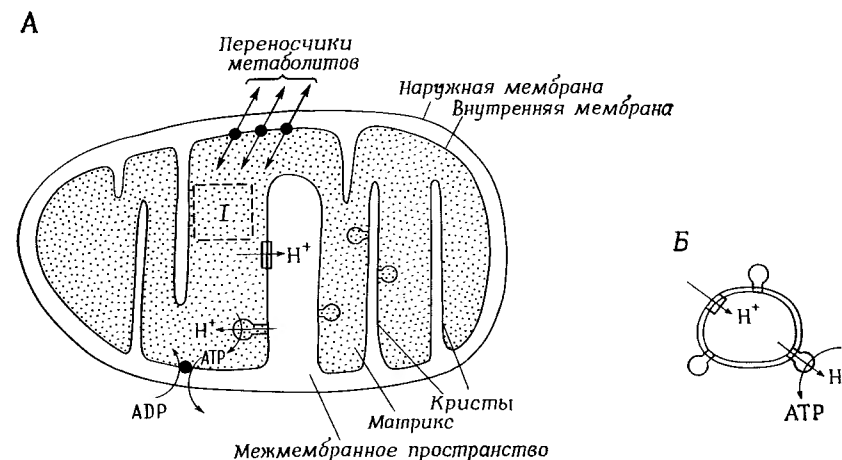


Рис. 1.4. Различные митохондриальные препараты. А. Интактная митохондрия. I — цикл лимонной кислоты. Б. Субмитохондриальная частица.

Наружная мембрана митохондрий содержит белки, которые образуют неспецифические поры, пропускающие вещества с молекулярной массой менее 10 000 (Zalman et al., 1980). Внутренняя мембрана является сопрягающей. Чем выше дыхательная активность ткани, из которой получены митохондрии, тем больше складок имеет внутренняя мембрана. На той стороне внутренней мембраны, которая обращена в матрикс (М-сторона), при негативном контрастировании фосфовольфрамом можно наблюдать грибовидные выросты, представляющие собой каталитические единицы АТФ-синтетазных комплексов. Все ферменты цикла трикарбоновых кислот локализованы в матриксе, за исключением сукцинатдегидрогеназы, которая связана с М-стороной внутренней мембраны. Пулы NAD и NADP в матриксе и в цитозоле отделены друг от друга, в то время как АТФ и АДФ могут обмениваться между матриксом и цитозолем через обменный переносчик адениновых нуклеотидов, локализованный во внутренней мембране.

Митохондрии обычно выделяют путем мягкого разрушения ткани в изотоническом растворе сахарозы с последующим дифференциальным центрифугированием, которое позволяет отделить митохондрии от ядер, обломков клеток и микросом (фрагментов эндоплазматического ретикулума). Этот метод пригоден лишь для нежных тканей, таких, как печень. В случае более плотных тканей, таких, как сердечная мышца, их вначале обрабатывают протеазами (типа нагарс, например) или разрушают в гомогенизаторе. Митохондрии из дрожжей выделяют после переваривания клеточной стенки с помощью пищеварительных ферментов улитки.

При разрушении митохондрий ультразвуком образуются вывернутые субмитохондриальные частицы (СМЧ) (рис. 1.4), которые называют также электронтранспортными частицами (ЭТЧ). Эти частицы имеют центры связывания субстратов дыхательной цепи и АТФ-синтазы на внешней поверхности и потому широко используются в экспериментах (Lee, 1979).

1.3.2. ДЫШАЩИЕ БАКТЕРИИ И МЕМБРАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ ИЗ НИХ

(Обзоры: Kaback, 1974; Konings, 1979)

Некоторые вопросы, связанные с биоэнергетикой бактерий, могут быть исследованы в intactных клетках. В то же время у многих бактерий, прежде всего грамотрицательных, клеточная стенка образует барьер, плохо проницаемый для различных веществ. По этой причине в экспериментах часто используют сферопласты — клетки, лишенные стенки с помощью лизоцима (рис. 1.5). В сферопластах сохраняется все клеточное содержи-

мое и правильная ориентация мембраны, но они становятся осмотически чувствительными.

При продавливании клеток под высоким давлением через очень узкое отверстие в прессе Френча можно получить вывернутые мембранные везикулы, аналогичные субмитохондриальным частицам. Если же сферопласты подвергнуть гипотоническому лизису, то образуются пустые пузырьки («тени»), сохраняющие исходную ориентацию мембраны; их иногда называют «кабакосомы».

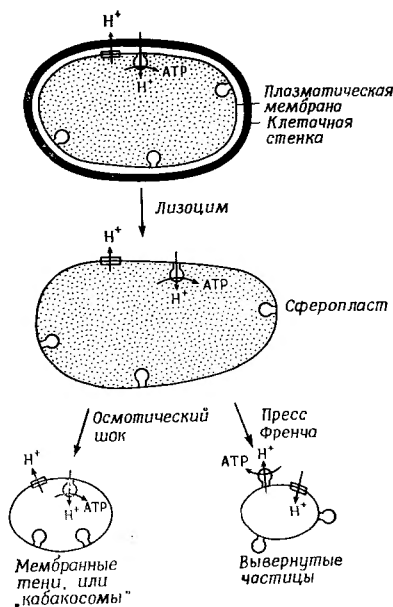


Рис. 1.5. Различные препараты из дышащих бактерий.

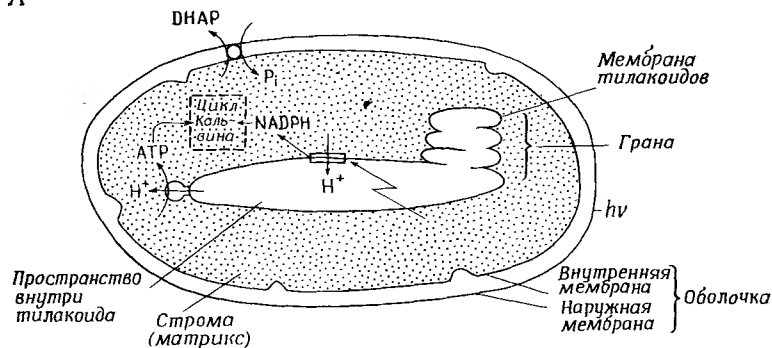
1.3.3. ХЛОРОПЛАСТЫ

(Обзор: Park, Sane, 1971)

Хлоропласты — это один из типов пластид — мембранных пузырьков, встречающихся в клетках зеленых водорослей и высших растений. В этих клетках может насчитываться от одного до сотен хлоропластов. Хлоропласты в среднем значительно крупнее, чем митохондрии: их диаметр составляет 4 — 10 мкм, а толщина — 1 — 2 мкм (рис. 1.6). Хлоропласт заключен в оболочку из двух близко прилежащих друг к другу мембран. Матрикс, находящийся под внутренней мембраной, называется стромой. В строме расположены мембранные везикулы, которые называют тилакоидами. Несколько тилакоидов, собранных в стопку, образуют грану. Мембрана тилакоидов содержит пигменты фотосинтеза и фотосинтетическую цепь переноса электронов. Эта мембрана является сопрягающей: освещение приводит к переносу протонов внутрь тилакоида. АТФ-синтаза хлоропластов локализована в мембране тилакоидов и ориентирована так, что грибовидные выросты обращены в строму. АТФ и NADPH, образующиеся при фотофосфорилировании, используются затем для фиксации CO_2 в темновых реакциях цикла Кальвина, которые протекают в строме.

На первый взгляд кажется, что структуры хлоропластов и митохондрий сильно различаются, однако в действительности существенное различие между ними состоит лишь в том, что тилакоиды, в отличие от митохондриальных крист, отделены от внутренней мембраны. Таким образом, пространство внутри

А



Б

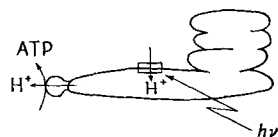


Рис. 1.6. Препараты, получаемые из хлоропластов. А. Интактный хлоропласт. Б. Ламеллярная система в разрушенном хлоропласте. Отметим, что мембрана тилакоидов остается intactной.

тилакоидов представляет собой отдельный компартмент, тогда как пространство внутри крист является продолжением межмембранного пространства митохондрий.

Хлоропласты получают с помощью мягкой гомогенизации листьев в изотоническом растворе сахарозы или сорбитола при рН 8,0. Благодаря такому рН компенсируется закисление среды при разрушении вакуолей. После фильтрования через муслин гомогенат центрифугируют при небольших скоростях для отделения обломков клеток. Хлоропласты обычно осаждают центрифугированием при 1000—2000 g в течение 4 мин. Эта процедура позволяет получать хлоропласты с интактными внутренней и наружной мембранами (интактные хлоропласты). Такие хлоропласты способны с высокой скоростью фиксировать CO_2 , так как в них сохраняется содержимое стромы, однако они редко используются в биоэнергетических исследованиях, поскольку многие субстраты и ингибиторы не проникают через мембрану хлоропласта и не могут достичь мембраны тилакоидов. Исследования функций тилакоидов можно проводить на хлоропластах, полученных в 0,35 M NaCl. В них разрушены наружная и внутренняя мембраны, и они неспособны фиксировать CO_2 , но здесь тилакоиды доступны для субстратов и ингибиторов (разрушенные хлоропласты).

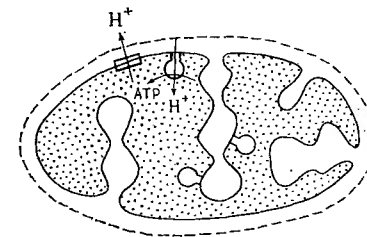
1.3.4. ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ И ХРОМАТОФОРЫ

(Обзор: Clayton, Sistrom, 1979)

Существуют три группы прокариот, способных катализировать фотосинтетический перенос электронов, — это зеленые бактерии, пурпурные бактерии и цианобактерии (или сине-зеленые водоросли). Пурпурные бактерии разделяют на две группы: Rhodospirillaceae (или несерные) и Chromatiaceae (или серные). Цианобактерии способны катализировать нециклический перенос электронов (разд. 6.4), используя в качестве донора электронов воду, и в этом отношении они сходны с хлоропластами. Из перечисленных выше групп организмов наиболее интенсивно изучается биоэнергетика пурпурных бактерий. Это происходит по двум причинам. Во-первых, механическое разрушение этих клеток (например, при продавливании суспензии под очень высоким давлением через узкое отверстие в ячейке пресса Френча) позволяет получить замкнутые пузырьки внутренней мембраны, которые называют хроматофорами (рис. 1.7). Хроматофоры сохраняют способность к фотосинтетическому сопряжению и имеют ту же ориентацию мембраны, что и субмитохондриальные частицы. Они служат наиболее удобным объектом для изучения цепи переноса электронов и хемиосмотического сопряжения. Второе преимущество пурпурных бактерий состоит в том, что из них могут быть выделены так называемые реакционные центры — первичные фотохимические комплексы (разд. 6.2).

Кроме перечисленных групп бактерий широко распространен

А



Б

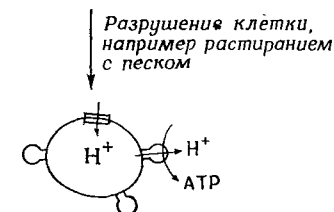


Рис. 1.7. Препараты из фотосинтезирующих бактерий. А. Пурпурная бактерия. Б. Хроматофор.

ным объектом исследования в биоэнергетике служат некоторые галофильные виды. Они имеют уникальную систему энергообеспечения, в которой в качестве светозависимой протонной помпы функционирует единственный белок — бактериородопсин (разд. 6.6).

1.3.5. РЕКОНСТРУИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ

(Обзоры: Kagawa, 1972; Racker, 1975)

Важнейшее положение хемиосмотической теории состоит в том, что система окислительного фосфорилирования может быть функционально и структурно разделена на окислительные и фосфорилирующие протонпереносящие комплексы. Такое же разделение возможно и в случае фотосинтетического фосфорилирования. После разделения очищенные протонные помпы можно встроить в искусственные замкнутые мембранные пузырьки и наблюдать их протонпереносящую активность. Подобная реконструкция позволяет, во-первых, проверить различные аспекты хемиосмотической теории. (Все ли комплексы, участвующие в трансформации энергии, переносят протоны? Способен ли каждый из таких комплексов переносить протоны самостоятельно или только в сочетании с какой-то гипотетической протонной помпой?) Во-вторых, реконструкция позволяет определить состав минимальной функционирующей единицы, что является первым шагом на пути изучения механизма работы протонной помпы.

Мембранные комплексы выделяют обычно после солюбилизации с помощью неденатурирующих детергентов (разд. 5.5). Затем их можно реконструировать

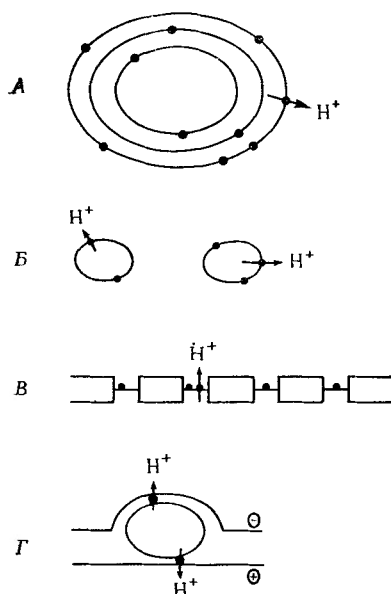


Рис. 1.8. Некоторые системы для реконструкции протонпереносящих комплексов. А. Диализ. Суспензию смеси комплексов с природными или синтетическими фосфолипидами в холате медленно диализуют, чтобы убрать детергент. Б. Обработка ультразвуком. Смесь комплексов и фосфолипидов обрабатывают ультразвуком в отсутствие детергентов. Образуются однослойные липосомы. В. Бислой на миллипоре. Бислойные участки, содержащие комплексы, образуются в порах мембранного фильтра, так что общая площадь плоской мембраны оказывается очень большой. Г. Липосомы сливаются с бислойной («черной») плоской мембраной, что позволяет проводить прямые измерения электрического потенциала.

в виде искусственных мембран различной структуры (рис. 1.8). Обработка смеси комплексов с фосфолипидами ультразвуком приводит к образованию монослойных мицелл или липосом (рис. 1.8, Б). С помощью другого метода суспензию комплексов и липидов, содержащую также желчные соли (холат, дезоксихолат), диализуют против буфера, что приводит к медленному понижению концентрации детергента (холата) и образованию многослойных липосом (рис. 1.8, А). Липосомы можно затем приклеивать к плоскому липидному бислою и проводить прямые измерения электрического потенциала (Drachev et al., 1974; рис. 1.8, Г). Такой плоский бислой можно создать также, пропитав липидами миллипоровый фильтр (Skulachev, 1976; Blok et al., 1977; рис. 1.8, В).

В связи с различной ориентацией реконструированных комплексов в мембране возникает ряд проблем. Иногда значительная кривизна поверхности мембраны приводит к тому, что все белки в ней ориентированы одинаково, однако чаще всего ориентация носит случайный характер. Чтобы предотвратить работу помп в противоположных направлениях, используют не проникающие через мембрану субстраты. В этом случае активными оказываются лишь те ферменты, которые ориентированы своими субстратсвязывающими центрами наружу.

1.4. ПРЕДПОСЫЛКИ ХЕМИОСМОТИЧЕСКОЙ ГИПОТЕЗЫ

(Обзоры: Mitchell, 1966, 1968, 1976 b, 1979 a, b; Greville, 1969)

В этом разделе мы кратко рассмотрим взаимоотношения между хемиосмотической и другими гипотезами энергетического сопряжения в той последовательности, как они развивались после появления первой публикации Митчелла (Mitchell, 1961). При таком подходе возникают две проблемы: во-первых, предполагается, что читатель знаком с основами биоэнергетики, и, быть может, начинающие в этой области предпочтут пропустить этот раздел, пока различные концепции не станут им более понятными; во-вторых, многие читатели, достаточно знакомые с основами, могут не согласиться с интерпретацией автора. Во всяком случае, мы хотели бы вслед за Гревиллом сохранить «доброжелательный, но строгий» взгляд на хемиосмотическую гипотезу (Greville, 1969).

К началу 60-х годов были установлены все основные пути превращения энергии в митохондриях (Ernster, Lee, 1964). Неизвестной оставалась лишь природа центрального переносящего энергии интермедиата. Каждая из выдвигавшихся в это время гипотез энергетического сопряжения должна была учитывать ряд основных наблюдений:

а) Дыхательная (или электронпереносящая) цепь представ-

ляет собой линейную последовательность переносчиков электронов, включающую три различных участка, на которых энергия окисления может использоваться для синтеза АТФ.

б) Скорость дыхания снижается, если не происходит синтез АТФ (дыхательный контроль).

в) Сопряжение между дыханием и синтезом АТФ может быть нарушено целой группой агентов, названных разобщителями, которые нарушают дыхательный контроль (т. е. стимулируют дыхание в отсутствие синтеза АТФ) и стимулируют гидролиз АТФ в митохондриях.

г) Антибиотик олигомицин (разд. 7.2) ингибирует как синтез, так и стимулируемый разобщителями гидролиз АТФ.

д) Энергия, выделяемая при дыхании, может использоваться не только для синтеза АТФ, но и для накопления Ca^{2+} и для восстановления NAD^+ и NADP^+ .

е) Те же энергозависимые процессы могут происходить за счет гидролиза АТФ в анаэробных условиях, причем они ингибируются как разобщителями, так и олигомицином.

Функционирование всех путей передачи энергии (рис. 1.9, А) можно объяснить, если постулировать существование общего переносящего энергию интермедиата, который принято обозначать значком « $\sim$ ». Единственным примером биоэнергетического механизма, включающего подобный интермедиат, служит субстратное фосфорилирование, катализируемое глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и фосfogлицераткиназой в гликолизе (рис. 1.10). В этих реакциях окисление субстратов приводит к образованию связи фермента с фосфатом. Эта так называемая макроэргическая связь имеет очень высокую свободную энергию гидролиза. Затем фосфат может быть перенесен на ADP. В случае приложения этой схемы «химического сопряжения» к митохондриям (Slater, 1953) требовалось лишь учесть следующие экспериментальные данные. Во-первых, то, что во всех трех «пунктах сопряжения» образуется единый общий интермедиат, и,

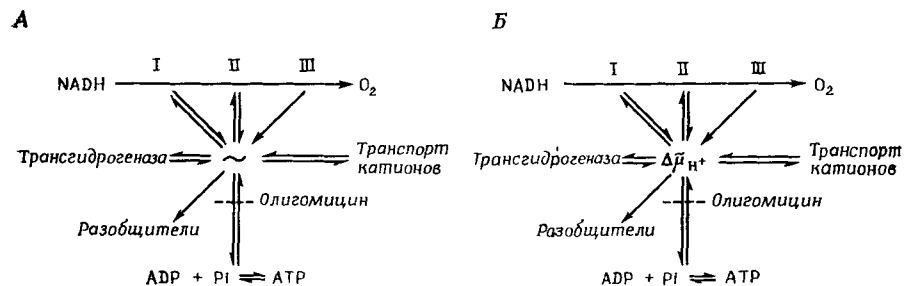


Рис. 1.9. Пути превращения энергии в митохондриях. А. Химическая гипотеза. Б. Хемисмотическая гипотеза.

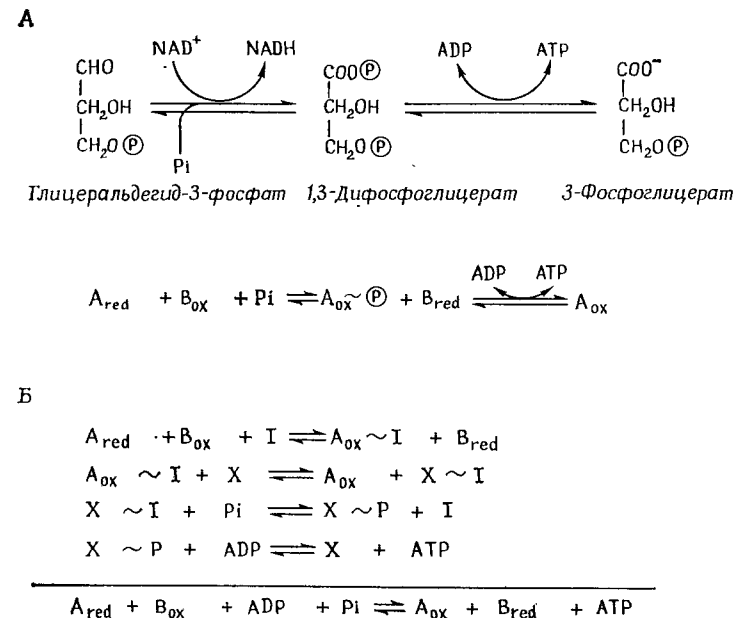


Рис. 1.10. Синтез АТФ при химическом сопряжении. А. Субстратное фосфорилирование в гликолизе. Б. Гипотетическое химическое сопряжение в окислительном фосфорилировании.

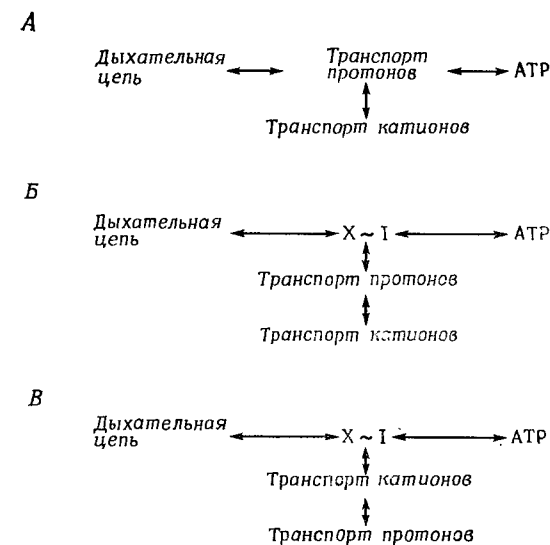


Рис. 1.11. Различные схемы взаимоотношений между дыханием и транспортом протонов и катионов. А. Хемисмотическая. Б. Протонная помпа, использующая энергию химического интермедиата. В. Катионная помпа, использующая энергию химического интермедиата.

во-вторых, то, что существуют независимые от фосфата пути превращения энергии (рис. 1.10). Эту относительно простую схему пришлось значительно усложнить после того, как была обнаружена способность митохондрий накапливать катионы, такие, как Ca^{2+} (разд. 8.4). Пришлось предположить существование катионных помп, использующих энергию интермедиата (рис. 1.11, В). Новые данные о переносе протонов при дыхании привели к появлению гипотезы о первичной роли протонных помп, использующих энергию интермедиата (рис. 1.11, Б).

Стало общепризнанным, что проверка химической гипотезы возможна лишь путем идентификации и выделения одного или нескольких предполагаемых «высокоэнергетических» интермедиатов. Однако, за исключением нескольких вводящих в заблуждение сообщений, ни в одной из работ интермедиаты обнаружить не удалось, хотя гипотеза предсказывала существование трех интермедиатов — производных компонентов дыхательной цепи (таких, как NAD^+ или цитохромы), которые вряд ли могли быть пропущены при спектроскопических исследованиях.

Первоначально хемиосмотическая гипотеза возникла не в связи с проблемой окислительного фосфорилирования, а в связи с механизмом активного транспорта веществ через клеточные мембраны, выяснению которого был посвящен ряд работ Митчелла. Особенно Митчелла интересовал вопрос, как ненаправленные (в пространстве) химические реакции могут вызывать направленный (векторный) перенос веществ через мембрану. Он предположил, что структура транспортных белков позволяет субстратам и продуктам проникать в активный центр и покидать его лишь по определенным путям (рис. 1.12). В гипотетическом при-

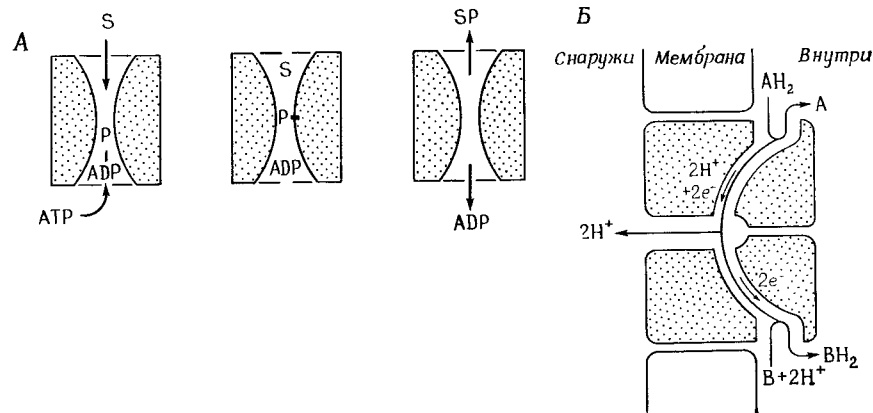


Рис. 1.12. Гипотетические модели векторного переноса групп. А. Векторный перенос фосфорильной группы P от АТФ на субстрат S (Mitchell, Moyle, 1958). Б. Векторный перенос протонов (Mitchell, 1979a).

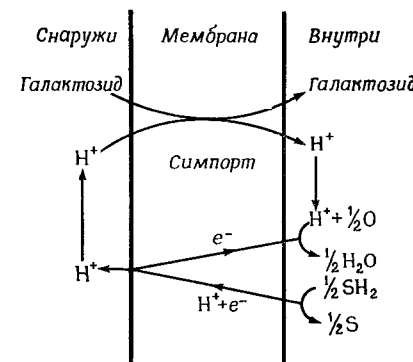
мере, показанном на рис. 1.12, А, происходит векторный перенос по белку фосфорильного остатка P от АТФ к субстрату S . Митчелл назвал такой процесс векторной транслокацией групп. На рис. 1.12, Б показан более сложный пример, в котором белок, катализирующий перенос $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ от восстановленного субстрата AH_2 к окисленному B , имеет такую структуру, что протоны и электроны движутся различными путями. Такова была

основная модель Митчелла для переноса протонов в дыхательной цепи. Электроны переносятся от донора A к акцептору B по «петле», имеющей две ветви: в первой 2H (или правильнее $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) из AH_2 связаны с простетической группой типа FAD , а вторая включает только электронный переносчик, например железосерный центр (разд. 5.2). При переносе электронов от переносчика атомов водорода к переносчику электронов освобождаются протоны, которые выделяются векторно на наружной стороне мембраны (рис. 1.12). Хемиосмотический механизм позволял легко объяснить работу энергетических систем транспорта через мембрану ионов и метаболитов. Транспортные системы могут быть либо первичными (если транслокация групп прямо сопряжена с превращением метаболита), либо вторичными (если в них используется энергия электрохимического гра-

Рис. 1.13. Хемиосмотическая схема транспорта β -галактозида у *E. coli*.

диента ионов, создаваемого первичными системами) (рис. 1.13). Митчелл в 1961 г. отмечал, что модели сопряжения переноса электронов с транспортом протонов рассматривались еще в 40-х годах (Lundegårdh, 1945; рис. 1.14). Новизна гипотезы Митчелла состояла в предположении, что АТФ-синтетаза в митохондриальной и фотосинтетической мембранах также способна переносить протоны и таким образом использовать энергию $\Delta\mu\text{H}^+$, образующейся в электронпереносящей цепи, для синтеза АТФ (рис. 1.15).

Одновременно с хемиосмотической гипотезой Вильямс (1961) предложил другой гипотетический механизм сопряжения также с участием протонов и разделением зарядов. В этой гипотезе протоны передавались от дыхательной цепи к АТФ-синтетазе прямо внутри мембраны, а выход их в раствор мог быть лишь побочной реакцией (см. обзоры: Williams, 1976, 1978a). Оба автора так и не пришли к соглашению о том, какая из двух гипотез возникла первой (Mitchell, 1977; Williams, 1978 b).



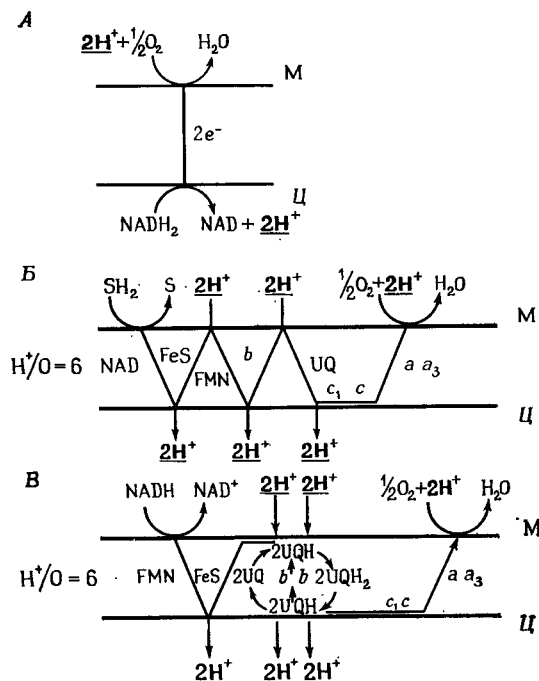


Рис. 1.14. Различные гипотетические механизмы транспорта протонов в электронпереносящих цепях. А. По Ландегарду (Lundegardh, 1945). Б. По Митчеллу (Mitchell, 1966). В. По Митчеллу (Mitchell, 1975b).

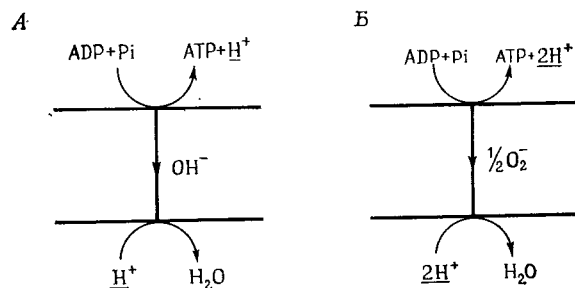


Рис. 1.15. Модель векторной транслокации групп в АТФ-синтазе [по Митчеллу в модификации Гревилла (Grevill, 1949)]. А. $1\text{H}^+/\text{ATP}$. Б. $2\text{H}^+/\text{ATP}$.

Хемиосмотическая гипотеза в том виде, как она была предложена и развивалась Митчеллом, оставалась тесно связанной с концепцией векторной транслокации групп. Белкам дыхательной цепи отводилась пассивная роль: они содержали простетические группы и формировали векторные пути переноса. В 1965 г. Бойер впервые сформулировал идею о том, что при окислительно-восстановительных переходах в белках происходят конформационные изменения, в частности такие изменения происходят в АТФ-синтазе. В «конформационной теории», в ее первоначальном виде, предполагалось, что конформационные изменения, возникающие в дыхательной цепи, могут прямо передаваться близко расположенной АТФ-синтазе и вызывать в ней «напряжение», энергия которого используется для синтеза АТФ. В этой модели не было места протонному градиенту. Хотя гипотеза прямого конформационного сопряжения и не выдержала испытания временем (Boyer et al., 1977), но идея о важной роли конформационных переходов в механизме переноса протонов получила широкую поддержку как альтернатива гипотезе векторной транслокации групп (разд. 5.4).

Наиболее привлекательной чертой хемиосмотической гипотезы для исследователей, занимающихся биоэнергетикой, было то, что она позволяла сразу предложить ряд экспериментов, в которых можно было бы проверить ее предсказания. В результате дальнейшее обсуждение проблемы велось по трем направлениям. Во-первых, верен ли главный постулат и является ли протонный электрохимический градиент необходимым и достаточным условием энергетического сопряжения? Во-вторых, является ли протонный цикл делокализованным, происходит ли он во внешней водной фазе, согласно Митчеллу, или же существуют локальные протонные микроциклы между отдельными комплексами дыхательной цепи и АТФ-синтазы согласно Вильямсу? В-третьих, какова роль векторной транслокации групп и конформационных изменений белков в молекулярном механизме переноса протонов?

Митчелл высказал четыре основных предположения, проверка которых была необходима для доказательства основного постулата о протонном электрохимическом сопряжении. Мы кратко остановимся на некоторых, наиболее важных экспериментах. Более полное описание этих работ можно найти в обзорах Гревилла (Greville, 1969) и Митчелла (Mitchell, 1976 b).

1. Дыхательная и фотосинтетическая электронпереносящие цепи должны переносить протоны через мембрану

Энергозависимый перенос протонов был впервые обнаружен на препаратах «разрушенных» хлоропластов (Неуманн, Jagendorf, 1964). Перенос протонов в митохондриях был впервые за-

регистрован Митчеллом и Мойл (Mitchell, Moyle, 1965, 1967 а) в опытах, где добавка небольшого пульса O_2 к анаэробной суспензии митохондрий вызывала закисление среды (разд. 3.4). Низкие концентрации разобщителя ускоряли спад протонного градиента после исчерпания кислорода. Было показано, что стехиометрия выброса протонов согласуется с гипотезой транслокации групп (т. е. $2 H^+/2 e^-$ на петлю) (разд. 5.4). В условиях постоянного дыхания была получена величина $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ более 200 мВ (Mitchell, Moyle, 1969а; разд. 4.2). Направление переноса протонов было обратным в вывернутых субмитохондриальных частицах (Mitchell, Moyle, 1965). Скулачев и др. (Skulachev et al., 1970) показали, что митохондрии могут использовать протонный градиент для накопления самых различных липофильных катионов. Субмитохондриальные частицы и хроматофоры, имеющие обратную ориентацию мембран, также накапливали липофильные анионы. Поскольку крайне маловероятно, что в митохондриях существуют энергозависимые ионные помпы, проявляющие специфичность ко всем этим синтетическим ионам, можно утверждать, что «первичной катионной помпы» (рис. 1.11, В) не существует. В дальнейшем было показано, что очищенные комплексы дыхательной цепи могут работать как автономные протонные помпы в реконструированных системах (разд. 5.5). Это позволило отвергнуть альтернативную «химическую гипотезу» существования общей протонной помпы, использующей энергию высокоэнергетического интермедиата (рис. 1.11, Б).

2. АТФ-синтетаза должна работать как обратимая протонпереносная АТРаза

Добавка небольших количеств АТФ к суспензии анаэробных митохондрий приводила к выбросу протонов; затем наблюдался медленный спад протонного градиента. Этот спад можно было ускорить, добавив разобщители (Mitchell, Moyle, 1968). Очищенные АТФ-синтетазные комплексы, встроенные в липосомы, также катализировали перенос протонов (Kagawa et al., 1973; разд. 7.4). Гидролиз АТФ может поддерживать $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ более на мембране 200 мВ (Nicholls, 1974). Искусственно созданный мембранный потенциал способен поддерживать синтез АТФ (Jagendorf, Uribe, 1966).

3. Сопрягающие мембраны должны иметь низкую протонную проводимость

Вывод о низкой проницаемости мембраны для протонов следует из опытов, где наблюдалась корреляция между действием различных агентов, повышающих протонную проводимость ис-

кусственных бислойных мембран, и их разобщающим действием на митохондриях. Протонная проницаемость была измерена более прямо в опытах Митчелла и Мойл (Mitchell, Moyle, 1967b), где определялась скорость спада искусственно созданного градиента рН за счет входа протонов в матрикс митохондрий.

4. Сопрягающие мембраны должны содержать специфические обменные переносчики, позволяющие метаболитам проникать через мембрану и сохранять осмотическую стабильность в условиях высокого мембранного потенциала

Спад ΔpH , наступающий после прекращения дыхания, ускоряется такими анионами, как сукцинат, фосфат, малонат, а также катионом Na^+ (Mitchell, Moyle, 1976b). Транспорт этих анионов происходит, по-видимому, вместе с протоном, а Na^+ переносится в обмен на протон. Измерения скорости набухания недышащих митохондрий в присутствии солей аммония позволили Чеппеллу и сотрудникам (Chappell, Crofts, 1966; Chappell, Naarhoff, 1967; Chappell, 1968) показать, что целый ряд переносчиков транспортирует анионы как незаряженные частицы либо вместе с протонами, либо в обмен на другие анионы (разд. 8.3; Mitchell, Moyle, 1969b).

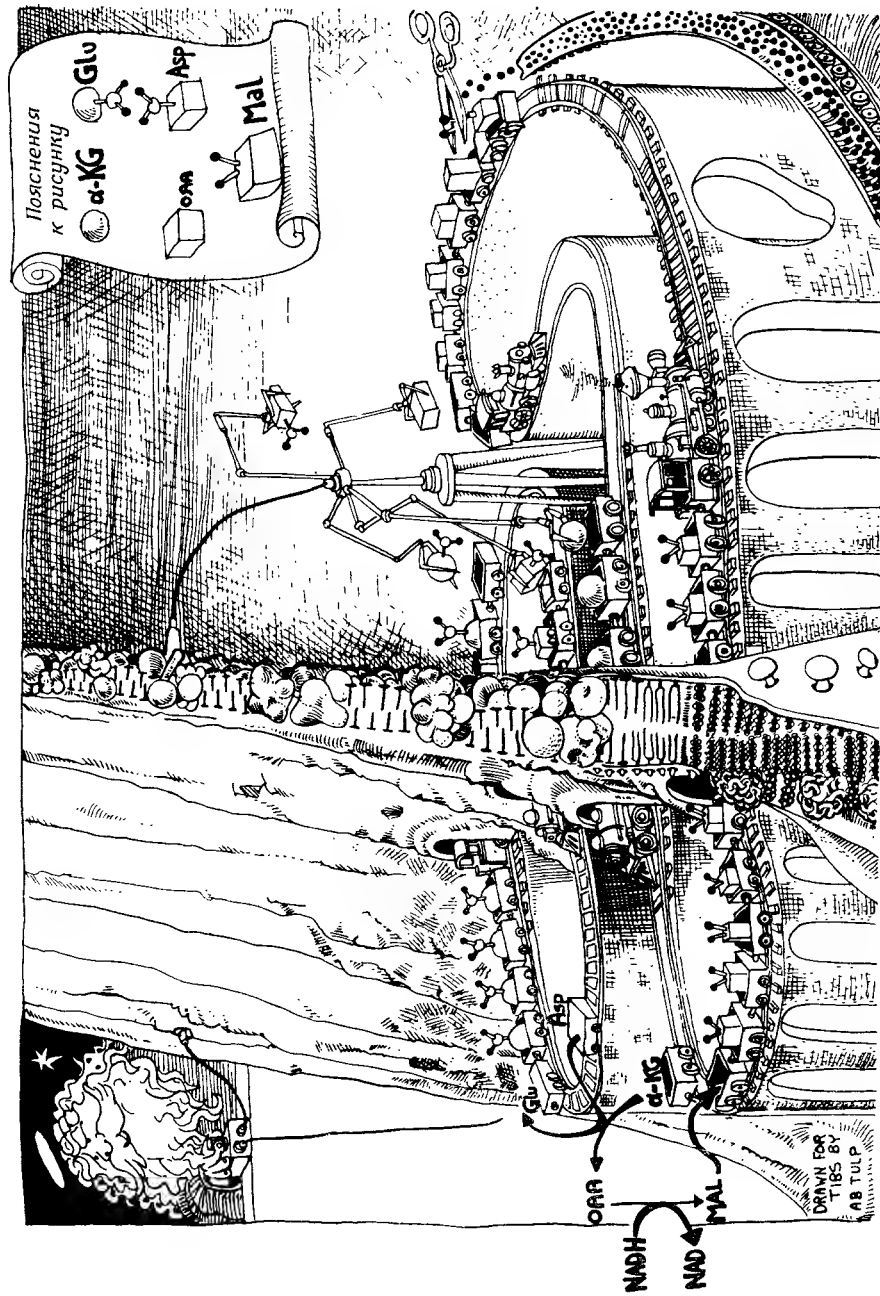
Второй важнейшей проблемой, обсуждаемой в связи с хемиосмотической гипотезой, является вопрос о степени делокализации протонных токов и о выходе протонов из мембраны в водную фазу. Предположения о существовании локальных протонных циклов были высказаны рядом авторов (Rottenberg, 1975; Kell, 1979) на основании данных по соотношению скоростей дыхания, фосфорилирования и величины $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Это соотношение иногда не соответствовало предсказаниям модели делокализованного протонного градиента. Есть, однако, и контраргументы, указывающие на существование протонного цикла, делокализованного по всей органелле. Так, например, одна молекула протонного переносчика грамицидина (разд. 2.5) может вызвать заметное разобщение по всему хлоропласту (Junge, Witt, 1968). В галофильных бактериях (разд. 6.6) бактериородопсиновые протонные помпы собраны в специальных областях мембраны и далеко отстоят от АТФ-синтетазных комплексов.

Несмотря на то что противоречия в этом вопросе еще не разрешены, мы, следуя принципу из двух объяснений выбирать более простое, будем придерживаться концепции делокализованного хемиосмотического сопряжения.

Третий главный вопрос, о механизме работы протонных помп, остается открытым и не будет решен окончательно, пока мы не исследуем окислительно-восстановительные реакции в комплексах дыхательной цепи в той же степени, в какой сейчас изучена

реакция оксигенации гемоглобина. В гипотезе Митчелла о транслокации групп предъявляется ряд требований как к стехиометрии переноса протонов, так и к последовательности расположения переносчиков в цепи (разд. 4.3 и 5.4). В настоящее время (1981 г.) эта гипотеза находит большую поддержку среди исследователей в области бактериального и фотосинтетического сопряжения, чем у специалистов, изучающих работу митохондриальной электронпереносящей цепи и АТР-синтазы.

В заключение еще раз отметим, что основной постулат хемиосмотической гипотезы опирается на большой экспериментальный материал. Именно на этой основе будет строиться изложение в нашей книге.



Малат-аспаратный челнок позволяет переносить восстановительные эквиваленты от цитоплазматического NADH в матрикс митохондрий (рис. 8.2).

ТРАНСПОРТ ИОНОВ ЧЕРЕЗ СОПРЯГАЮЩИЕ МЕМБРАНЫ

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Возникновение хемиосмотической гипотезы вызвало значительные перемены в подходе к изучению процессов, связанных с транспортом ионов. Из области исследования вторичных явлений, побочных реакций энергетического сопряжения, изучение энергозависимого транспорта ионов превратилось в центральную проблему биоэнергетики. Так, в частности, после сравнения действия ионофоров и жирорастворимых ионов на сопрягающие мембраны и на искусственные липидные бислои был сделан вывод о первичной роли в сопряжении трансмембранного потенциала. В этой главе мы рассмотрим основные свойства проницаемости мембран и действие ионофоров, создающих дополнительные специфические пути проникновения для ионов.

2.2. СТРУКТУРА СОПРЯГАЮЩИХ МЕМБРАН

(Обзор: De Pierre, Ernster, 1977)

Жидкостно-мозаичная модель структуры мембран (Singer, Nicolson, 1972) очень хорошо объясняет свойства сопрягающих мембран (рис. 2.1). Согласно этой модели, основная часть фосфолипидов в мембране образует бислой, в котором полярные головки молекул обращены в водную фазу. Мембранные белки могут быть как периферическими (внешними), так и интегральными (внутренними) в зависимости от глубины их размещения в гидрофобной области бислоя. Некоторые интегральные белки пересекают мембрану от одного ее края до другого, что позволяет им катализировать трансмембранный транспорт. В этой главе мы остановимся на различиях между транспортом, катализируе-

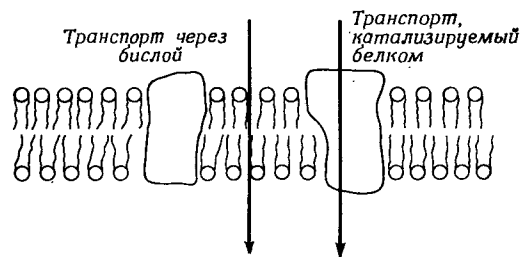


Рис. 2.1. Жидкостно-мозаичная модель мембраны. Согласно этой модели, транспорт веществ может происходить как через бислойные, так и через белковые участки. Свойства этих двух путей транспорта сильно различаются.

мым белками, и транспортом через бислойные участки мембраны.

Хотя жидкостно-мозаичную структуру мембраны обычно представляют в виде белковых «айсбергов», плавающих в липидном море, в случае сопрягающих мембран это не совсем так. Благодаря высокому содержанию белков (50% внутренней митохондриальной мембраны составляют интегральные белки, 25% — периферические и 25% — липиды) эти мембраны имеют относительно плотную упаковку. Бислойные участки составляют менее 60% мембраны. Различные сопрягающие мембраны имеют несколько разный липидный состав: 10% липидов внутренней мембраны митохондрий составляет кардиолипид; в случае мембран тилакоидов хлоропластов фосфолипиды составляют лишь 10% липидов, остальные — это галактолипиды (40%), сульфолпиды (4%) и фотосинтетические пигменты (40%). Несмотря на такие различия липидного состава, свойства бислойных участков различных мембран в отношении исходной и индуцированной ионофорами проницаемости достаточно сходны. Это позволяет использовать для их описания данные, полученные на искусственных бислойных мембранах. В то же время свойства белковых транспортных систем могут быть уникальными не только для данных органелл, но и для данной ткани. Так, например, внутренняя мембрана митохондрий из печени крысы содержит транспортные системы, которых нет в митохондриях из ее сердечной мышцы (разд. 8.3).

2.3. ПУТИ ИОННОГО ТРАНСПОРТА

Для транспорта иона через мембрану необходимо существование как пути переноса, так и движущей силы. Движущей силой может служить концентрационный градиент, электрический потенциал, метаболическая энергия или комбинация этих факторов (эти вопросы мы обсудим в гл. 3). В данной главе мы рассмотрим природные и искусственные пути переноса ионов в сопрягающих мембранах.

При изучении любого транспортного процесса возникает ряд вопросов.

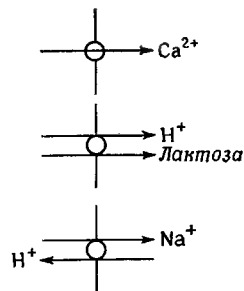
- Пересекает ли данный ион мембрану сам по себе, или его транспорт сопряжен с движением другого иона (рис. 2.2)?

Транспортный процесс, в котором участвует один ион, называют унипортом. Примерами унипорта являются перенос Ca^{2+} через внутреннюю мембрану митохондрий (разд. 8.4) или перенос протона в бислоях при добавлении таких протонных переносчиков, как динитрофенол (разд. 2.5). Транспортный процесс, требующий сопряженного переноса двух или более ионов в од-

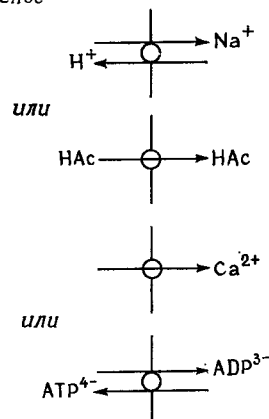
А (1) Унипорт

(2) Симпорт

(3) Антипорт



Б (1) Электронейтральный перенос



(2) Электрогенный перенос

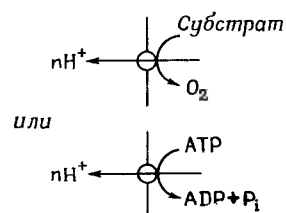
В (1) Перенос, не сопряженный непосредственно с метаболизмом, например любой из вариантов А и Б
(2) Перенос, сопряженный с метаболизмом

Рис. 2.2. Классификация систем транспорта ионов.

ном направлении, называют симпортом или котранспортом. В ряде случаев наблюдается симпорт метаболитов с протоном через плазматическую мембрану бактерий (разд. 8.5). Транспорт ионов, жестко сопряженный с переносом других веществ в про-

тивоположном направлении, называют антипортом или обменной диффузией. Примерами могут служить Na^+/H^+ -антипорт во внутренней мембране митохондрий (разд. 2.6) и K^+/H^+ -антипорт, катализируемый ионофором нигерицином в бислоях (разд. 2.5). Если одним из ионов, участвующих в обменном транспорте, оказывается H^+ или OH^- , то обычно невозможно отличить симпорт вещества с H^+ от антипорта с OH^- . Например, перенос фосфата в митохондриях может быть представлен и как P_i/OH^- -антипорт, и как H^+/P_i -симпорт (разд. 7.5).

б) Связаны ли сопряженные друг с другом движения ионов с переносом заряда через мембрану (рис. 2.2)?

Если в результате транспорта веществ через мембрану заряд не переносится, то такой транспорт называют *электронейтральным*. Транспорт может быть электронейтральным при переносе незаряженного вещества, при симпорте катионов и анионов или при антипорте двух ионов равного заряда. Примером последнего является K^+/H^+ -антипорт, катализируемый нигерицином. Транспорт, связанный с переносом заряда, обычно называют *электрогенным* («создающим потенциал») или *электрофоретическим* («использующим предсуществующий потенциал»). Поскольку эти два термина обычно применяют к одному и тому же процессу, наблюдаемому в разных условиях, можно пользоваться более общим термином «электрический».

Очень важно не смешивать электрический баланс транспортных систем на молекулярном уровне, который мы обсуждаем, и общую электронейтральность суммарного переноса ионов через данную мембрану. Эта электронейтральность определяется тем, что нельзя разделить сколько-нибудь значительные количества положительных и отрицательных зарядов, не создав большого мембранного потенциала. Так, разделение 1 нмоля зарядов на внутренних мембранах 1 г митохондрий создаст на них потенциал более 200 мВ (разд. 4.2). Однако это не является препятствием для существования отдельных электрогенных процессов на молекулярном уровне до тех пор, пока они друг друга компенсируют (разд. 2.7). Нужно отметить, что результат работы прочно сопряженного электронейтрального антипортера в сопрягающей мембране вовсе не совпадает с действием двух электрогенных унипортеров для тех же ионов.

в) Сопряжен ли транспорт непосредственно с метаболизмом (рис. 2.2)?

Прочное сопряжение транспорта с метаболизмом происходит при работе ионных помп, которые являются основным компонентом системы хемиосмотического сопряжения. К таким процессам

наиболее применим термин «активный транспорт», который не следует применять к любым процессам переноса ионов против градиента концентрации. Накопление ионов может происходить и без участия ионных помп либо за счет мембранного потенциала, либо сопряженно (симпортом или антипортом) с транспортом других ионов по градиенту их концентрации. Так, например, Ca^{2+} может накапливаться в саркоплазматическом ретикулеуме при работе ионной помпы (Ca^{2+} — АТРаза), а также в митохондриях за счет мембранного потенциала (разд. 8.4). Лишь в первом случае транспорт происходит «активно», в митохондриях же Ca^{2+} поступает по электрохимическому градиенту.

Гипотеза транслокации групп (разд. 1.4) включает специфические молекулярные механизмы сопряжения транспорта ионов с метаболизмом.

г) Происходит ли транспорт через бислойные или белковые участки мембраны (рис. 2.1)?

Такое разделение транспортных систем вытекает непосредственно из жидкостно-мозаичной модели мембраны. Различия систем особенно важны в связи с тем, что механизмы транспорта через бислой, по-видимому, являются общими для различных мембран, а белковые транспортные системы в различных мембранах различны. Характеристики этих двух форм транспорта мы рассмотрим отдельно.

2.4. ПРИРОДНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ УЧАСТКОВ МЕМБРАНЫ

Гидрофобный слой, образованный липидным бислоем, создает эффективный барьер для заряженных веществ. Поэтому бислой, кроме некоторых важных случаев (разд. 2.5), непроницаем для катионов и анионов. Они непроницаемы также и для протонов, что является жизненно важным для энергетического сопряжения, так как благодаря этому предотвращается короткое замыкание в цепи протонного тока (разд. 4.5). Бислой обладает не только высоким электрическим сопротивлением, но и способностью выдерживать очень большие электрические поля. При мембранном потенциале 200 мВ напряженность электрического поля, приложенного к гидрофобному слою сопрягающей мембраны, превышает $300\,000\text{ В}\cdot\text{см}^{-1}$.

Бислой хорошо проницаем для незаряженных молекул H_2O , O_2 и CO_2 , а также для незаряженных форм многих низкомолекулярных кислот и оснований, таких, как аммиак и уксусная кислота. Это позволяет использовать их для изучения градиентов рН на мембранах (разд. 3.5).

2.5. ИНДУЦИРОВАННАЯ ИОНОФОРАМИ ИОННАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ УЧАСТКОВ МЕМБРАН

(Обзоры: Henderson, 1971; Pressman, 1976; Gomez-Poyou, Gomez-Lojero, 1977; Ovchinnikov, 1979)

Низкая ионная проницаемость бислойных участков обусловлена высокой энергией активации переноса ионов в гидрофобную фазу. Отсюда следует, что если заряд делокализован и при

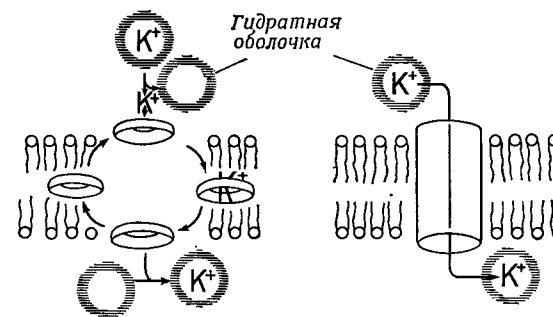


Рис. 2.3. Перенос иона K^+ с помощью подвижного переносчика (например, валиномицина; слева) и каналобразующего ионофора (справа).

его переносе через мембрану не происходит прямого контакта заряда с бислоем, то проницаемость для него может резко возрасти. Именно это наблюдается при действии некоторых антибиотиков, синтезируемых микроорганизмами, и ряда соединений, полученных путем химического синтеза. Такие соединения называют ионофорами. Их молекулярная масса обычно составляет 500—2000. Они имеют гидрофобную наружную поверхность, благодаря которой растворяются в липидах, и гидрофильную внутреннюю часть, связывающую ион. Не существует достаточно веских доказательств того, что ионофоры входят в состав природных сопрягающих мембран, однако при исследовании мембран они незаменимы.

Ионофоры могут быть либо подвижными переносчиками, либо могут образовывать каналы в мембране (рис. 2.3). Подвижные переносчики диффундируют через мембрану и способны обычно осуществлять транспорт около 1000 ионов в секунду. Они могут обладать очень высокой избирательностью в отношении ионов, функционируют в искусственных многослойных мембранах, и на их функционирование влияет вязкость мембраны. Напротив, ионофоры, образующие каналы, имеют низкую ионселективность, однако работают очень быстро, обеспечивая транспорт до 10^7 ионов в секунду на канал.

2.5.1. ПЕРЕНОСЧИКИ ЗАРЯДОВ, НЕ ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ ПРОТОНЫ

Валиномицин

Ионофор валиномицин (рис. 2.4) является подвижным переносчиком, катализирующим унипорт ионов Cs^+ , Rb^+ , K^+ или NH_4^+ . Его способность транспортировать Na^+ по крайней мере в 10^4 ниже, чем транспортировать K^+ . Валиномицин — это природный

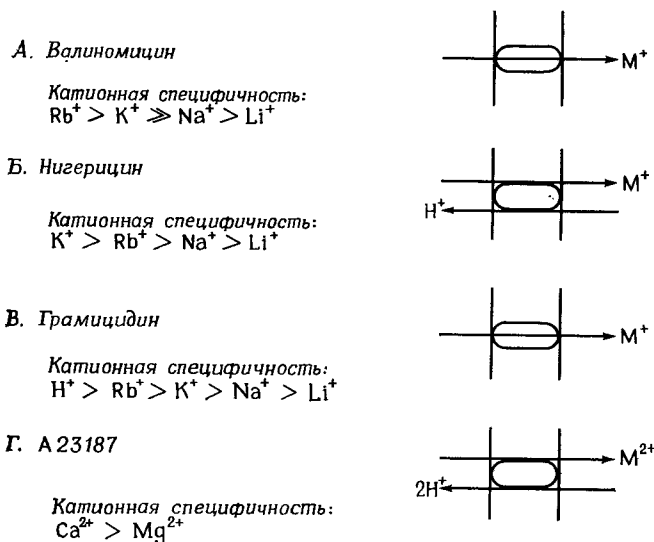


Рис. 2.4. Некоторые транспортные процессы, катализируемые ионофорами.

антибиотик, получаемый из *Streptomyces*. По структуре он представляет собой депсипептид, т. е. состоит из последовательности чередующихся гидроксид- и аминокислот. При связывании с ионофором ионы теряют свою гидратную оболочку (рис. 2.3). Na^+ плохо транспортируется потому, что в дегидратированном состоянии он слишком мал, чтобы эффективно взаимодействовать с обращенными внутрь молекулы валиномицина карбонильными группами. В результате энергия комплексообразования оказывается недостаточна, чтобы обеспечить дегидратацию иона. Поскольку валиномицин не заряжен и не несет ионизуемых групп, в комплексе с ионом его заряд равен заряду иона. Как свободная форма валиномицина, так и комплекс с ионом способны диффундировать через мембрану. Таким образом, каталитические количества ионофора могут обеспечить массовый транспорт катионов. В случае митохондрий, хлоропластов и искусственных бислоев

валиномицин эффективен в концентрации 10^{-9} М, а в случае бактерий его эффективность несколько ниже.

Сопрягающие мембраны не имеют, как правило, природных электрогенных переносчиков K^+ . Применение ионофора позволяет индуцировать проницаемость для K^+ и таким образом создать (разд. 4.2) или рассеять (разд. 4.3) мембранный потенциал, а также исследовать транспорт анионов (разд. 2.7).

Существуют и другие ионофоры, катализирующие унипорт K^+ , такие, как энниатины и нактины (нонактин, монактин, динактин и др., названные по числу этильных групп в молекуле). Однако эти ионофоры не имеют такой высокой селективности к K^+ по сравнению с Na^+ , как валиномицин.

Грамицидин

Грамицидин представляет собой каналобразующий ионофор (рис. 2.4), который формирует в бислое короткоживущие проводящие димеры. Это характерно для каналобразующих ионофоров с низкой селективностью для протонов, моновалентных катионов и NH_4^+ . Ионы переносятся по этим каналам, не теряя гидратной оболочки. Проводимость каналов определяется лишь скоростью диффузии ионов, что позволяет пропускать через один канал до 10^7 ионов в секунду.

2.5.2. ПЕРЕНОСЧИКИ ПРОТОНОВ, ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ ПРОТОНЫ В ОБМЕН НА ДРУГИЕ ИОНЫ

Нигерицин

Нигерицин — это линейная молекула, содержащая гетероциклические кислородсодержащие кольца и гидроксильную группу. В мембране молекула нигерицина циклизуется и образует структуру, сходную со структурой валиномицина, в которой атомы кислорода образуют гидрофобную область. В отличие от валиномицина нигерицин при связывании с катионом теряет протон. В результате образуется нейтральный комплекс, который затем диффундирует через мембрану как подвижный переносчик. Нигерицин подвижен также в свободной протонированной форме. Таким образом, он катализирует электронейтральный в сумме обмен K^+ на H^+ (рис. 2.4). К другим ионофорам, катализирующим сходный электронейтральный обмен, принадлежат X-537A, моненсин и дианемицин. Последние два переносят Na^+ немного лучше, чем K^+ , а X-537A образует комплексы практически с любыми катионами, в том числе с органическими аминами.

Нигерицин используется для изучения транспорта анионов (разд. 2.7), а также для изменения градиента pH через сопря-

гающие мембраны. Обычно считается, что нигерицин снижает ΔpH на мембране, однако в действительности он лишь уравнивает градиенты K^+ и H^+ и, следовательно, окончательный вид ионных градиентов зависит от условий эксперимента.

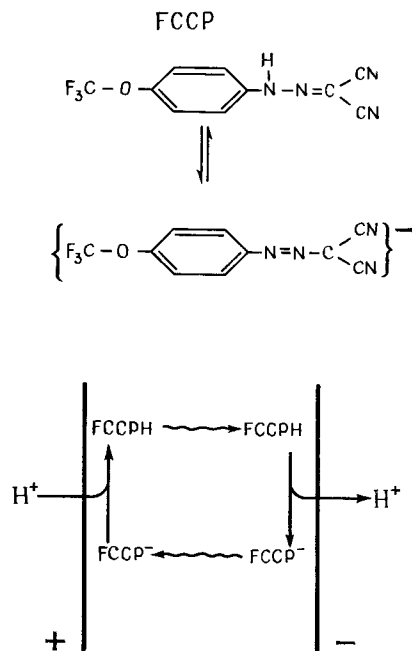


Рис. 2.5. Протонные переносчики, катализирующие унипорт протонов через мембрану. Протонные переносчики (разобщители) — это липофильные слабые кислоты, которые проникают через липидный бислой как в протонированной, так и депротонированной форме. Если на мембране существует протонный электрохимический потенциал (разд. 3.4), то протонный переносчик катализирует перенос протонов и рассеивание потенциала. FCCRP⁻ (анион карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона) движется к положительно заряженной стороне мембраны за счет мембранного потенциала (разд. 3.4), а FCCRPH переносится в направлении объема со щелочным pH за счет градиента pH на мембране (разд. 3.5). Разобщители типа FCCRP работают на мембранах многих типов в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-9} М.

A23187

A23187 — это ионофор, несущий карбоксильные группы и проявляющий высокую специфичность в отношении двухвалентных катионов по сравнению с одновалентными. Он катализирует электронейтральный обмен Ca^{2+} или Mg^{2+} на два H^+ , не влияя на градиенты одновалентных ионов.

2.5.3. ПЕРЕНОСЧИКИ ПРОТОНОВ И ЗАРЯДОВ

Протонные переносчики (разобщители)

Протонные переносчики имеют протондонорные или протонакцепторные группы и способны пересекать мембрану либо в виде протонированных кислот, либо в виде конъюгированных оснований (рис. 2.5). Это оказывается возможным благодаря существующей в их молекулах системе π -орбиталей, обеспечивающей делокализацию заряда анионной формы и ее растворимость в липиде. Пересекая, как челнок, мембрану, разобщители катализируют электрогенный унипорт протонов и понижают сопротивление мембраны для протонов. Возникающий при этом протонный ток приводит к короткому замыканию (разд. 4.5) и разобщению генератора $\Delta \mu H^+$ и АТР-синтазы. Разоб-

щающее действие некоторых соединений было описано задолго до появления хемиосмотической теории. Когда было показано, что большинство этих соединений работают, понижая протонное сопротивление липидного бислоя, это явилось важным указанием в пользу хемиосмотической гипотезы и против гипотезы химического сопряжения, в которой предполагалась специфическая способность разобщителей гидролизовать высокоэнергетические интермедиаты.

Непрямой перенос протонов можно индуцировать при одновременном возникновении унипорта иона и электронейтрального антипорта этого иона в обмен на протон. Так, например, комбинация валиномицина и нигерицина индуцирует суммарный унипорт H^+ , тогда как K^+ циклически переносится через мембрану.

2.5.4. ЛИПОФИЛЬНЫЕ КАТИОНЫ И АНИОНЫ

Способность системы π -орбиталей делокализовывать заряд иона и повышать его растворимость в липиде была использована для синтеза ряда катионов и анионов, способных пересекать бислойные мембраны, не меняя заряда (рис. 2.6). Эти ионы не

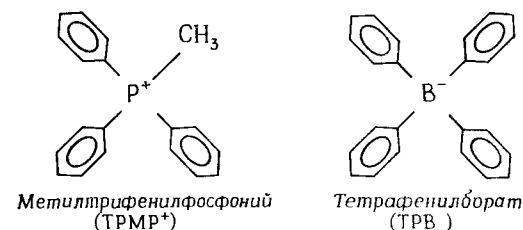


Рис. 2.6. Примеры синтетических липофильных ионов.

являются ионофорами, так как они не действуют каталитически, а переносятся электрофоретически при образовании $\Delta \psi$ на мембране (разд. 4.4). Липофильные катионы и анионы сыграли важную роль. Опыты, в которых наблюдалось их энергозависимое накопление в митохондриях (катионы) и вывернутых субмитохондриальных частицах (анионы) (разд. 1.4), позволили исключить возможность существования специфических катионных помп, использующих высокоэнергетические интермедиаты (Skulachev, 1971). Впоследствии эти ионы были использованы для определения величины $\Delta \psi$ (разд. 4.2).

2.6. ТРАНСПОРТ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ БЕЛКАМИ

(Обзор: Wilbrant, 1974)

Свойства белковых систем, катализирующих транспорт через сопрягающие мембраны, обычно сильно отличаются от свойств бислойных участков как в присутствии, так и в отсутствие ионофоров. Транспортные белки обладают многими свойствами, присущими ферментам: они проявляют стереоспецифичность, часто их можно специфически ингибировать, они генетически детерминированы. Последнее обстоятельство делает невозможной ту степень обобщения, которая применима к транспорту через бислой. Например, если FCCP (рис. 2.5) индуцирует протонную проводимость в митохондриях, то можно смело полагать, что его эффект будет тем же в случае хлоропластов, бактерий или искусственного бислоя. В отличие от FCCP транспортный белок может быть специфическим не только для данной органеллы, но и для органеллы из определенной ткани. Например, переносчик цитрата существует в митохондриях из печени, где он участвует в переносе промежуточных соединений синтеза жирных кислот (разд. 8.3), но отсутствует в митохондриях из сердца. Иногда утверждают, что для белковых транспортных систем характерна кинетика насыщения. Хотя в некоторых случаях это может быть верным, в целом кинетика транспортных процессов настолько сложна (особенно если они зависят от мембранного потенциала), что интерпретация ее требует большой осторожности.

Самым убедительным доказательством участия белка в транспорте является существование специфических ингибиторов. Например, долгие годы считалось, что пируват проникает в митохондрии через бислой. Это вполне возможно, так как он является монокислотой слабой кислоты. Однако было обнаружено, что цианогидроксицинамат (разд. 8.3) специфически ингибирует транспорт. Это явилось первым строгим доказательством существования переносчика пирувата (LaNoue, Schoolworth, 1979).

Транспортные белки изучались с помощью многих подходов, что привело к появлению избытка названий, таких, как переносчики, пермеазы, портеры и транслоказы. Все они являются синонимами транспортных белков.

2.7. ДВИЖЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ СОПРЯГАЮЩИЕ МЕМБРАНЫ

Суспензия, приготовленная из митохондрий, — мутная. Величина ее светорассеяния является функцией разности между коэффициентами преломления содержимого матрикса и средой. Всякий процесс, снижающий эту разницу, уменьшает и светорассеяние. Увеличение объема матрикса, вызванное входом проникающих веществ, приводит, как ни странно, к понижению светорассеяния, так как показатель преломления матрикса приближается к показателю преломления среды. Благодаря этим

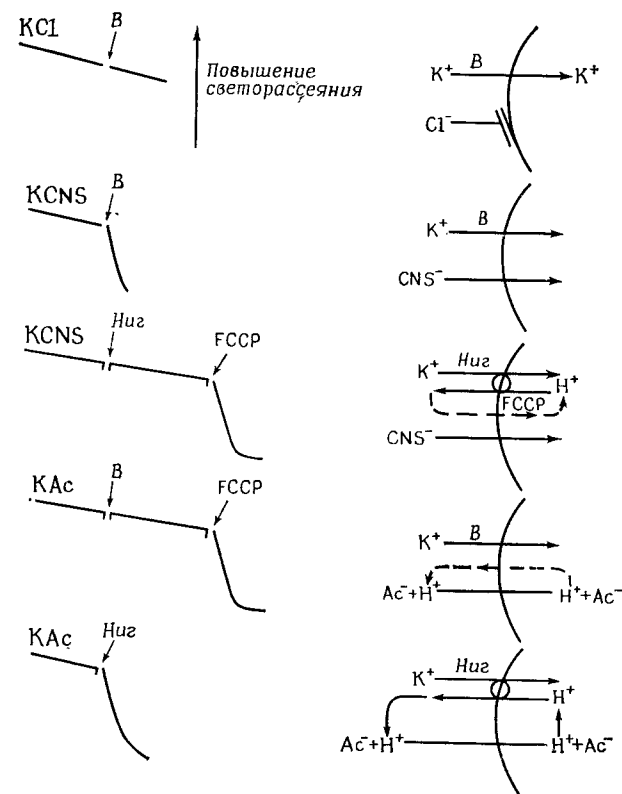


Рис. 2.7. Условия для набухания недышащих митохондрий. В — валиномицин; Ниг — нигерицин; Ас — ион ацетата.

изменениям можно довольно просто наблюдать за потоками веществ через внутреннюю мембрану митохондрий. Митохондрии оказываются пригодными для таких наблюдений потому, что их матрикс сильно увеличивается в объеме без разрыва внутренней мембраны просто за счет разворачивания крист. «Набухание» может приводить к разрушению наружной мембраны и выходу в раствор аденилаткиназы, локализованной в межмембранном пространстве. Светорассеяние регистрируют либо по уменьшению проходящего света в обычном спектрофотометре, либо более чувствительным методом, с помощью флуориметра, измеряя непосредственно рассеянный свет под углом 90° к падающему лучу.

Для того чтобы наблюдать набухание митохондрий в ионной среде, необходимо выполнение двух условий: во-первых, и катионы, и анионы основного осмотического компонента среды должны проникать через мембрану, во-вторых, должен сохраняться суммарный баланс переноса зарядов через мембрану. В про-

стейшем случае рассмотрим митохондрию, в которой не работает ни дыхательная цепь, ни АТФ-синтаза. В примере, приведенном на рис. 2.7, исследовалась проницаемость митохондрий печени крысы для ионов Cl^- и CNS^- . Митохондрии, суспендированные в 120 мМ KCl или 120 мМ KCNS , набухали слабо. Однако это еще не указывает на низкую проницаемость внутренней мембраны для выбранных анионов, так как рассматриваемая мембрана плохо проницаема для K^+ . Преодолеть этот барьер можно, индуцировав электрогенный унипорт K^+ с помощью валиномицина (разд. 2.5). Действие этого ионофора можно предсказать заранее, предполагая, что он вызывает в бислойных участках данной мембраны тот же тип проводимости, что и в искусственных бислоях. После добавления валиномицина в среде с KCNS наблюдается быстрое набухание, но оно остается медленным в присутствии KCl . Теперь можно заключить, что внутренняя мембрана проницаема для CNS^- , но не для Cl^- . Этот вывод оказывается верным, хотя и несколько преждевременным, так как не были учтены проблемы, возникающие в связи с балансом зарядов.

Чтобы учесть их, рассмотрим также набухание митохондрий в среде, содержащей ацетат калия (рис. 2.7). Чтобы исключить препятствия, связанные с низкой проницаемостью мембраны для калия, в среду добавляли ионофоры (валиномицин или нигерицин). Видно, что скорость набухания зависит от свойств проводимости, индуцированной ионофором: нигерицин эффективен только в среде с ацетатом калия, а валиномицин вызывает быстрое набухание только в присутствии KCNS . Причина различий состоит в необходимости поддержания баланса зарядов. Вход K^+ , катализируемый валиномицином, электрогенен, а ацетат проникает через бислой в форме нейтральной протонированной кислоты. Поэтому на мембране быстро возникает большая $\Delta\psi$ (положительный заряд внутри), что предотвращает дальнейший вход K^+ . Проникновение уксусной кислоты также прекращается, так как перенесенный вместе с ней протон диссоциирует в матриксе и создается градиент pH (кислота в матриксе), который препятствует дальнейшему входу уксусной кислоты (разд. 3.5). Эти проблемы не возникают в случае нигерицина, поскольку вход катиона и аниона оказывается электронейтральным, а протон, перенесенный вместе с уксусной кислотой, выводится ионофором в обмен на K^+ . По тем же причинам митохондрии набухают в присутствии KCNS и валиномицина, но не KCNS и нигерицина. Таким образом, набухание можно использовать не только для выяснения того, проникает ли данное вещество через мембрану, но и для определения способа переноса. Например, с помощью этой техники было показано, что вход Ca^{2+} в недышащие митохондрии происходит по механизму унипорта (Selwyn et al., 1970; разд. 8.4).

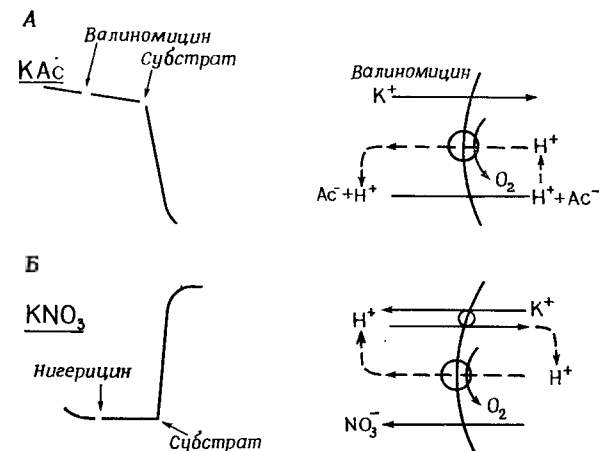


Рис. 2.8. Сравнение оптимальных условий для набухания и сокращения дышащих митохондрий. А. Оптимальное набухание. Б. Оптимальное сокращение набухших митохондрий.

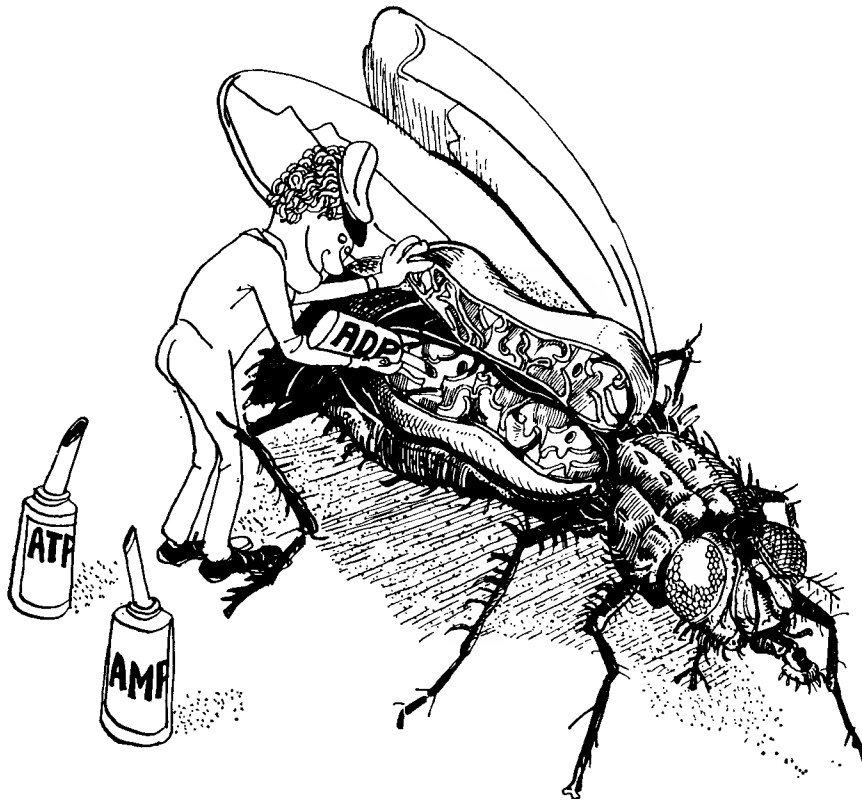
Для набухания обычно необходимо, чтобы оба иона проникали через мембрану по единому механизму — либо электрогенно, либо электронейтрально. Можно, однако, вызвать набухание и в том случае, если это условие не выполняется. Для этого нужно индуцировать электрогенный перенос протонов с помощью переносчика типа FCCP (рис. 2.7). Тот факт, что классические разобщители окислительного фосфорилирования (разд. 1.4) действовали согласно предсказаниям хемиосмотической теории в недышащих митохондриях (где не могло быть гипотетических высокоэнергетических интермедиатов), явился важным свидетельством в пользу этой теории (разд. 1.4). Митохондрии бурого жира имеют природный переносчик, вызывающий короткое замыкание протонного тока (разд. 4.5) во внутренней мембране. Он был впервые обнаружен с помощью той же техники набухания.

При исследовании изменений объема матрикса в дышащих митохондриях необходимо учитывать вклад протонов, переносимых через мембрану при работе дыхательной цепи. Набухание, зависящее от дыхания, можно наблюдать в присутствии электрогенно проникающего катиона (который накапливается в соответствии с мембранным потенциалом), а также электронейтрально проникающей слабой кислоты (которая накапливается по градиенту pH) (разд. 3.5), как показано на рис. 2.8.

Можно наблюдать также быстрое сокращение набухших митохондрий, вызванное дыханием. При этом матрикс должен содержать катион, выбрасываемый электронейтрально (по ΔpH), и анион, который выбрасывается электрофоретически (по $\Delta\psi$).

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА: ИЗМЕРЕНИЕ ДВИЖУЩИХ СИЛ

3.1. ВВЕДЕНИЕ



9В TULP

В этой главе мы рассмотрим основные положения термодинамики в их приложении к биоэнергетике. В этой области биоэнергетики ошибки встречаются чаще всего, поскольку большинство биохимиков (как и автор) не имеют достаточной подготовки по физической химии. В основном мы ограничимся рассмотрением вопросов, представляющих интерес для биоэнергетики, но в то же время попытаемся развеять мистический ореол вокруг некоторых важнейших термодинамических соотношений, получив их на основании общедоступных формул. Мы настоятельно советуем читателю проследить за приводимыми преобразованиями хотя бы для того, чтобы избавиться от идеи, что АТР является высокоэнергетическим соединением. Наиболее важные части главы мы все же отметили чертой слева, чтобы проще было к ним возвращаться.

Термодинамика рассматривает три типа систем: изолированные (или адиабатические) системы, полностью автономные и не обменивающиеся ни веществом, ни энергией с окружающей средой; замкнутые системы, также не обменивающиеся веществом, но способные обмениваться энергией; открытые системы, обменивающиеся с окружающей средой и веществом, и энергией. Сложность термодинамического описания этих систем возрастает по мере снижения степени изоляции системы. Классическая равновесная термодинамика не может дать точного описания открытых систем, так как поток вещества через их границы препятствует установлению истинного равновесия внутри системы. Поскольку все биоэнергетические системы являются открытыми (они обмениваются субстратами и продуктами со средой), очень важно учитывать ограничения в приложении равновесной термодинамики к этой области.

Здесь можно применять классическую термодинамику, но лишь в тех пределах, когда реально предсказание условий установления равновесия в системе энергетического сопряжения и направления потока энергии при отклонении от этого равновесия. С помощью термодинамики нельзя доказать существование какого-то механизма, но реально показать невозможность его существования, если предлагаемый механизм противоречит термодинамическим законам. В условиях, близких к равновесию,

равновесные параметры могут быть использованы в уравнениях неравновесной термодинамики (описывающих открытые системы), что дает информацию о скоростях потоков энергии.

В изолированной системе движущей силой реакции служит энтропия. Всякий процесс может идти самопроизвольно лишь в том случае, если он приводит к повышению энтропии системы. В замкнутой системе также существует энтропийная движущая сила, однако для предсказания возможности спонтанного протекания процесса необходимо учитывать суммарные изменения энтропии в системе и окружающей среде. Поскольку энтропийные изменения в окружающей среде редко удается измерить, необходимо вычислить суммарное изменение энтропии на основании измеряемых параметров внутри системы, таких, как изменение энтропии и поток энтальпии (тепла) через границы системы (рис. 3.1). Как в изолированных, так и в закрытых системах количественной мерой суммы всех движущих сил процесса является изменение свободной энергии ΔG (при постоянной температуре и давлении). Если процесс приводит к снижению свободной энергии ($\Delta G < 0$), это свидетельствует о том, что он вызывает суммарное повышение энтропии системы и ее окружения и, следовательно, может протекать самопроизвольно.

Собственно предмет биоэнергетики можно рассматривать как изучение механизма взаимопревращений различных форм свободной энергии. Изменения свободной энергии (называемой также энергией Гиббса) обычно описываются в биоэнергетике в следующих четырех вариантах: 1) собственно изменения свободной энергии используются для описания в целом реакций, в которых потребление субстрата дыхания приводит в конечном итоге к синтезу АТР; 2) окислительно-восстановительные реакции, происходящие при переносе электронов в дыхательной и фотосинтетических цепях (обычно описываются не в терминах изменений свободной энергии, а в производных терминах изменений

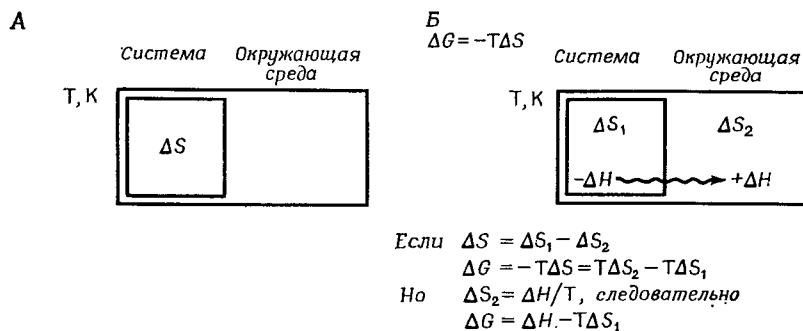


Рис. 3.1. Изменения свободной энергии в изолированной (А) и закрытой (Б) системах.

редокс-потенциалов); 3) энергию, запасенную в протонном градиенте, представляют количественно в другой форме изменений свободной энергии, называемой электрохимическим потенциалом протонов; 4) в системах фотосинтеза энергия, используемая после поглощения кванта света, может быть прямо сопоставлена с другими формами свободной энергии. Следует отметить, что все эти различия отражают историческую традицию описания различных элементов, соединенных в хемиосмотической теории сопряжения.

3.2. СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ

Рассмотрим простую реакцию $A \rightleftharpoons B$, которую характеризует константа равновесия K . Если абсолютная величина свободной энергии (G) может быть определена при различной глубине протекания реакции, то графическим изображением этой функции является парабола, как показано на рис. 3.2. Эта кривая обладает следующими свойствами:

1. Величина свободной энергии (G) достигает минимума, когда реакция достигает равновесия. Всякое отклонение отношения действующих масс $[B]/[A]$ от равновесия приводит к увеличению свободной энергии системы и, следовательно, не может происходить самопроизвольно.

2. Наклон кривой (производная) равен нулю в положении равновесия. Это означает, что при небольшой степени превраще-

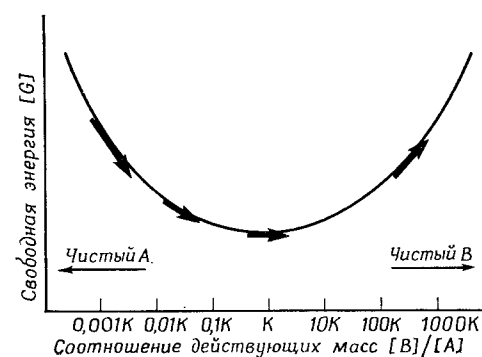


Рис. 3.2. Свободная энергия реакции как функция отклонения от равновесия. Закрытая система содержит компоненты А и В в концентрациях $[A]$ и $[B]$. А и В могут превращаться друг в друга в реакции $A \rightleftharpoons B$. Эта реакция достигает равновесия при соотношении действующих масс $[B]/[A] = K$. Кривая качественно показывает, как изменяется свободная энергия системы (G), если суммарное содержание $[A] + [B]$ остается постоянным, а соотношение компонентов отклоняется от равновесия. Стрелки схематически показывают изменения свободной энергии (ΔG) при небольших степенях превращения А в В для различных соотношений компонентов.

ния А в В, когда не происходит значительного изменения соотношения действующих масс, не происходит также и изменений в свободной энергии, т. е. ΔG (выражаемая в кДж·моль⁻¹) равно нулю при равновесии.

3. Если реакция $A \rightarrow B$ протекает вдали от равновесия, то небольшое превращение А в В приведет к уменьшению G , т. е. величина ΔG будет отрицательной и это превращение будет продолжаться самопроизвольно, если существует необходимый механизм.

4. Наклон кривой по мере приближения к равновесию уменьшается. Это означает, что ΔG становится тем меньше, чем ближе реакция к равновесию.

5. Для того чтобы реакция протекала далее, за точку равновесия, необходим приток свободной энергии, и, следовательно, такой процесс не может идти самопроизвольно.

Для более общего и количественного описания системы рассмотрим уравнение



Константа равновесия этой реакции выражается следующей формулой:

$$K = \frac{[C]_{\text{равн}}^c [D]_{\text{равн}}^d}{[A]_{\text{равн}}^a [B]_{\text{равн}}^b} M^{c+d-a-b} \quad (3.2)$$

В этом уравнении определяется соотношение действующих масс в состоянии равновесия, поэтому в него входят значения равновесных концентраций всех компонентов.

Если соотношение действующих масс определяется вдали от равновесия, то оно выражается формулой

$$\Gamma = \frac{[C]_{\text{набл}}^c [D]_{\text{набл}}^d}{[A]_{\text{набл}}^a [B]_{\text{набл}}^b} M^{(c+d-a-b)}. \quad (3.3)$$

Изменение свободной энергии при превращении a молей А и b молей В в С и D без значительного изменения величины Γ определяется по следующей формуле:

$$\Delta G = -2,3RT \lg K/\Gamma, \quad (3.4)$$

где 2,3 — это коэффициент пересчета натуральных логарифмов в десятичные, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Величина ΔG , таким образом, является функцией отклонения системы от равновесия. Коэффициент $2,3 RT$ позволяет рассчитать, что при 25°C реакция, протекающая в точке, отстоящей на порядок от точки равновесия, характеризуется величиной ΔG , равной 5,7 кДж·моль⁻¹. Величина изменения свободной энергии будет отрицательной, если наблю-

даемое соотношение действующих масс меньше константы равновесия, и положительной, если больше.

Полученные выше соотношения можно проиллюстрировать на примере реакции гидролиза АТФ до АДФ и P_i. При рН 7,0 и в присутствии 10 мМ Mg²⁺ эта реакция имеет кажущуюся константу равновесия $K' \simeq 10^5$ (Rosing, Slater, 1972):

$$K' = \frac{\Sigma [ADP] \Sigma P_i}{\Sigma ATP} = 10^5, \quad (3.5)$$

где каждая концентрация представляет собой сумму концентраций всех различных ионизованных компонентов, включая комплексы с Mg²⁺ (см. ниже). Поскольку равновесие достигается при величине Γ , равной 10⁵, то при концентрациях P_i 10 мМ и АДФ 10 мМ (обычно именно в этих концентрациях они содержатся в цитоплазме) равновесная концентрация АТФ составляет лишь 10⁻⁹ М.

Изменения величины ΔG при отклонении соотношения действующих масс от равновесия показаны в табл. 3.1. Митохондрии

Таблица 3.1

Изменения свободной энергии при гидролизе АТФ до АДФ + P_i как функция отклонения от равновесия¹

$K'(\text{pH}7, [\text{Mg}^{2+}] = 10\text{мМ}) = 1,0 \cdot 10^5$ Наблюдаемое соотношение действующих масс (Γ')	K'/Γ'	ΔG , кДж·моль ⁻¹	$[ATP]/[ADP]$ при $[P_i] = 10\text{мМ}$
10 ⁵	1	0	10 ⁻⁷
10 ³	10 ²	— 11,4	10 ⁻⁵
10	10 ⁴	— 22,8	10 ⁻³
1	10 ⁵	— 28,5	10 ⁻²
0,1	10 ⁶	— 34,2	10 ⁻¹
10 ⁻³	10 ⁸	— 45,6	10
10 ⁻⁵	10 ¹⁰	— 57	10 ³

¹ Точные значения см.: Rosing, Slater, 1972.

могут поддерживать соотношение действующих масс этой реакции в инкубационной среде на уровне 10⁻⁵ М, что на 10 порядков ниже равновесной величины (Slater et al., 1973). В этих условиях в среде может содержаться 10 мМ P_i, 10 мМ АТФ и лишь 10⁻⁵ М АДФ. Для дальнейшего синтеза АТФ митохондриями при условии постоянства этих концентраций требуется, в соответствии с табл. 3.1, 57 кДж свободной энергии на каждый моль. Отметим, что величина изменения свободной энергии при синтезе АТФ может быть получена из соответствующей величины, характеризующей гидролиз АТФ, простой переменной знака.

Рассмотрим частный случай общего выражения для величины ΔG [уравнение (3.4)] при наблюдаемом соотношении действующих масс, равном единице. Эти условия характеризуются величиной стандартной свободной энергии ΔG^0 :

$$\Delta G^0 = -2,3RT \lg K. \quad (3.6)$$

Подставляя это соотношение в уравнение (3.4), можно исключить константу равновесия:

$$\Delta G = \Delta G^0 + 2,3RT \lg G. \quad (3.7)$$

Это наиболее часто встречающаяся форма записи уравнения для изменений свободной энергии. Отметим, что величины K и G при таком рассмотрении лишены размерности.

Для того чтобы избежать ошибок или недоразумений при расчетах констант равновесия и величин изменения свободной энергии, следует учитывать ряд правил. Наиболее важными для биоэнергетики являются следующие:

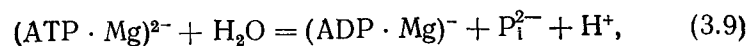
1. Истинные термодинамические константы равновесия рассчитываются на основании химических активностей, а не концентраций компонентов реакции. Обычно в биохимических системах невозможно определить активности всех компонентов, и константы равновесия рассчитывают, исходя из концентраций. Это не вносит ошибки до тех пор, пока наблюдаемые соотношения действующих масс и константы равновесия определяются при сопоставимых условиях.

2. В тех случаях, когда вода является субстратом или продуктом реакции, ее концентрацию принимают равной единице, а не 55 М. Это означает, что вода может не рассматриваться при описании равновесных состояний [см., например, уравнение (3.5)].

3. Если один или несколько реагентов или продуктов могут находиться в различных ионизованных формах или способны связывать катионы, то возникает вопрос: что использовать для определения константы равновесия — сумму концентраций всех форм реагентов или лишь тех форм, которые способны вступать в реакцию? Гидролиз АТФ до АДФ и P_i служит примером такого сложного случая. Все компоненты этой реакции частично ионизованы при физиологическом рН и способны связывать Mg^{2+} с различным сродством (Chappell, 1977). Так, АТФ может существовать при рН 7 в следующих формах:

$$[\Sigma \text{АТФ}] = [\text{АТФ}^{4-}] + [\text{АТФ}^{3-}] + [(\text{АТФ} \cdot \text{Mg})^{2-}] + [(\text{АТФ} \cdot \text{Mg})^-]. \quad (3.8)$$

Если установлено, что истинная реакция имеет вид



то выражение для константы равновесия имеет вид

$$K = \frac{[(\text{АДФ} \cdot \text{Mg})^-] [P_i^{2-}] [\text{H}^+]}{[(\text{АТФ} \cdot \text{Mg})^{2-}]}. \quad (3.10)$$

Определенное таким образом значение константы равновесия не будет зависеть от рН и Mg^{2+} , поскольку эти факторы входят в само уравнение. Однако формы реагентов, вступающие в реакцию, точно не известны, а определение их концентраций сильно затруднено, так как и ферментативные, и химические методы позволяют определить лишь суммарную концентрацию каждого вещества (например, $\Sigma \text{АТФ}$).

Поэтому на практике используются кажущиеся значения константы равновесия K' , рассчитанные, исходя из суммарных концентраций без учета эффектов ионизации и связывания ионов [уравнение (3.5)].

Наиболее важным ограничением при использовании значения K' является то, что оно не остается постоянным для данной реакции при постоянной температуре, а зависит от всех параметров, которые мы исключили из полного уравнения, например от рН и концентрации катиона. Таким образом, величина кажущейся константы равновесия верна лишь для данных значений рН и концентрации катиона и должна рассматриваться как характеристика этих условий. Тот же смысл имеет кажущаяся величина $\Delta G'^0$ (рН=x, $[Mg^{2+}]=y$), которую можно рассчитать, зная кажущуюся константу равновесия так же, как и в случае истинных параметров [уравнение (3.6)].

Для того чтобы рассчитать реальное изменение свободной энергии, необходимо выбрать значение $\Delta G'^0$ или K' , характерное для тех же условий, в которых проводится определение соотношения действующих масс:

$$\Delta G' = \Delta G'^0 + 2,3RT \lg G' \quad (3.11)$$

Очень часто встречается ошибочное утверждение о том, что фосфоангидридные связи в АТФ являются высокоэнергетическими (макроэргическими), что в них энергия может запасаться и затем использоваться для катализа реакций, протекающих в термодинамически невыгодном направлении. В то же время из данных табл. 3.1 должно быть ясно, что для определения способности реагентов совершить работу существенно отклонение соотношения их действующих масс от равновесия, а не свойства одного из компонентов. Некая гипотетическая клетка могла бы использовать любую реакцию для трансформации энергии, запасаемой в митохондриях. Например, если реакцию, катализируемую глюкозо-6-фосфатазой, поддерживать в состоянии, отстоящем на 10 порядков от равновесия, то глюкозо-6-фосфат будет также способен к совершению работы в клетке, как и АТФ. Напротив, можно наполнить Тихий океан смесью АТФ,

ADP и P_i, находящейся в равновесии, но АТФ в нем не сможет совершить никакой работы.

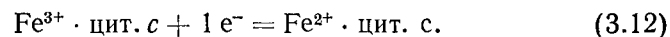
Вторая ошибка, которая еще встречается в литературе, — это путаница понятий реальных и стандартных изменений свободной энергии. Стандартные изменения свободной энергии являются просто иной формой представления константы равновесия [уравнение (3.6)]; они не дают никакой информации об условиях в клетке. Рассуждения об «эффективности» синтеза АТФ в митохондриях часто основываются на ошибочном использовании этих величин.

Свободную энергию АТФ-синтетазной реакции иногда для краткости называют «фосфорилирующим потенциалом», «фосфатным потенциалом» или ΔG_p . Чтобы упростить сравнение фосфатного потенциала с редокс- или электрохимическим потенциалом, ΔG_p часто выражают в милливольтгах (разд. 3.8).

3.3. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ (РЕДОКС) ПОТЕНЦИАЛЫ

Как митохондриальная дыхательная цепь, так и фотосинтетическая электронтранспортная цепь функционирует как последовательность реакций переноса электрона от одного компонента к другому. Многие из этих компонентов просто принимают один или несколько электронов, переходя из окисленной формы в восстановленную, у других присоединение электронов вызывает повышение рК одной или нескольких ионизируемых групп. В последнем случае восстановление переносчика сопровождается присоединением одного или нескольких протонов.

Цитохром *c* восстанавливается, присоединяя 1e⁻:



При восстановлении NAD⁺ присоединяется 2e⁻ и 1H⁺:



Восстановление убихинона (UQ) требует присоединения 2e⁻ и 2H⁺:

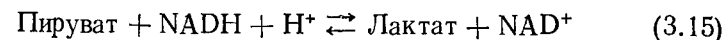


Последнюю реакцию обычно (хотя и не совсем точно) называют переносом двух атомов водорода.

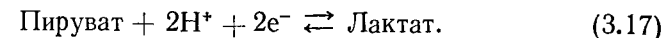
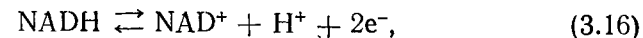
Все окислительно-восстановительные реакции достаточно хорошо описываются термодинамически с помощью изменения свободной энергии. Однако поскольку в этих реакциях происходит перенос электронов, при их описании обычно используют электрохимические параметры. Хотя термодинамические принципы остаются при этом неизменными, использование окислительно-восстановительных потенциалов в электрохимии часто

затрудняет понимание основных соотношений, касающихся изменения свободной энергии.

Электрохимическое описание редокс-реакции дает возможность разбить весь процесс на две полуреакции, включающие выделение и присоединение электронов. Например, реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой:



может быть представлена в виде двух полуреакций:



Пара окисленной и восстановленной форм, такая, как NADH/NAD⁺, называется редокс-парой.

Поскольку суммарная лактатдегидрогеназная реакция обратима, каждая из полуреакций также должна быть обратима и, следовательно, по крайней мере теоретически, можно определить константы равновесия этих реакций. Однако не вполне ясно, как следует учитывать электроны, которые не могут существовать независимо в растворе. С подобной проблемой сталкиваются в электрохимии при описании равновесия между металлом (т. е. восстановленной формой) и раствором его соли (т. е. окисленной формой). В этом случае способность пары служить донором электронов можно рассчитать, представив ее в виде электрической ячейки, состоящей из двух полуячеек, каждая из которых содержит металлический электрод в равновесии с 1 М раствором его соли. Электрический контур замыкается с помощью мостика, соединяющего растворы, но предотвращающего их смешивание. Разность электрических потенциалов между электродами может быть измерена с помощью потенциометра с высоким сопротивлением. Чтобы облегчить сравнение различных электродных потенциалов, их вычисляют относительно потенциала стандартного водородного электрода: $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.

Поскольку не существует электрода из твердого водорода, используется газообразный H₂, который при давлении 1 атм пропускается над поверхностью платинового электрода, покрытого мелко измельченной Pt (платиновой чернью) для увеличения поверхности. Когда такой электрод помещен в 1 М H⁺, его абсолютный потенциал принимается равным нулю (при 25°C). Стандартный электродный потенциал любой пары металл/соль можно легко определить, соединив этот электрод со стандартным водородным или, как чаще делают, с другим стандартным электродом, потенциал которого известен.

Аналогичный подход используют и для биохимических редокс-пар. Так же как и в случае водородного электрода, сделать электрод из восстановленного компонента пары невозможно

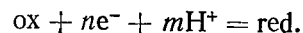
и вместо него используется платиновый электрод. В отличие от пар металл — соль и H_2 — H^+ в таком электроде оба компонента находятся в виде водных растворов. За стандартные условия принимаются такие, когда активности окисленного и восстановленного компонентов равны единице (или концентрации равны 1 М), т. е. они аналогичны условиям для определения стандартных изменений свободной энергии. Потенциал, определенный экспериментально (в стандартных условиях) относительно водородного электрода, называют стандартным редокс-потенциалом.

Лишь в немногих случаях, представляющих интерес для биоэнергетики, окисленные и восстановленные компоненты пары уравниваются с платиновым электродом достаточно быстро, чтобы можно было зарегистрировать стабильный потенциал. В большинстве случаев приходится добавлять еще одну редокс-пару, которая в небольших концентрациях реагирует как с первичной редокс-парой, так и с платиновым электродом и работает как редокс-медиатор. Как будет показано ниже, две редокс-пары находятся в равновесии при условии, что их редокс-потенциалы совпадают. До тех пор пока соотношение концентраций компонентов первой пары не меняется, электрод регистрирует неизменный потенциал этой пары. Использование одной или нескольких медиаторных пар особенно важно при изучении редокс-потенциалов мембрансвязанных компонентов (разд. 5.3).

Так же как и изменения свободной энергии, редокс-потенциалы зависят от соотношения концентраций реагентов и продуктов. Величина редокс-потенциала (E) пары $\text{ox} + ne^- = \text{red}$ при $\text{pH} = 0$ определяется соотношением

$$E = E_0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \cdot \lg \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}, \quad (3.18)$$

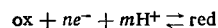
где E_0 — стандартный редокс-потенциал, определенный при концентрациях окисленной и восстановленной форм, равных единице. В тех случаях, когда в редокс-реакции участвуют протоны, полуреакция имеет вид



Стандартный редокс-потенциал при pH , отличном от нуля, становится более отрицательным, чем E_0 , на величину $2,3RT/F \cdot (m/n)$ мВ (на единицу pH). Это составляет -60 мВ/ pH при $m=n$ и -30 мВ/ pH при $m=1$ и $n=2$ (табл. 3.2). Эта поправка не применяется к водородному электроду, который остается постоянным электродом сравнения. В биоэнергетике редокс-потенциалы обычно определяют при pH 7. Стандартный редокс-потенциал, определенный в этих условиях, обычно называют потенциалом полувосстановления $E_{m,7}$. Отметим, что хотя E_0 во-

Таблица 3.2

Некоторые значения потенциалов полувосстановления



	n	m	$E_{m,7}$, мВ	Изменения E_m при повышении pH на 1, мВ
Ферредоксин ox/red	1	0	— 430	0
$\text{H}^+ / \frac{1}{2} \text{H}_2 (\text{H}_2 1 \text{ атм})$	1	1	— 420	— 60
$\text{NAD}^+ / \text{NADH}$	2	1	— 320	— 30
$\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$	2	1	— 320	— 30
Менахинон / менахинол	2	2	— 74	— 60
Фумарат / сукцинат	2	2	+ 30	— 60
UQ / UQH_2	2	2	+ 40	— 60
Феназинметосульфат	2	2	+ 80	— 60
Цит. $c^{3+} / \text{цит. } c^{2+}$	1	0	+ 220	0
$\text{TMPD}^+ / \text{TMPD}$	1	0	+ 260	0
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	1	0	+ 430	0
$\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$	1	0	+ 780	0
$\text{O}_2 / 2\text{H}_2\text{O}^1$	4	4	+ 820	— 60

¹) 1 атм O_2 и 55 М H_2O (чистая вода).

дородного электрода принимается для сравнения постоянным, но $E_{m,7}$ для пары $\text{H}^+ / \frac{1}{2} \text{H}_2$ составляет $7 \cdot (-60) = -420$ мВ.

Уравнение (3.18) теперь можно преобразовать для определения реальных редокс-потенциалов при pH , отличном от нуля:

$$E_h (\text{pH} = x) = E_m (\text{pH} = x) + 2,3 \frac{RT}{nF} \lg \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}. \quad (3.19)$$

Характерные изменения величины E_h при изменении соотношения окисленных и восстановленных компонентов показаны на рис. 3.3.

Использование редокс-потенциалов позволяет рассматривать обе редокс-пары в окислительно-восстановительной реакции независимо. Однако для описания термодинамического равновесия между парами пользуются разностью их редокс-потенциалов ΔE_m . Для реакции $\text{A}_{\text{red}} + \text{B}_{\text{ox}} \rightleftharpoons \text{A}_{\text{ox}} + \text{B}_{\text{red}}$ эта величина определяется как

$$\Delta E_h = E_h (\text{A}) - E_h (\text{B}). \quad (3.20)$$

Величина ΔE_h служит такой же характеристикой окислительно-восстановительной реакции, как и изменение свободной энергии, и может быть выражена в кДж·моль⁻¹:

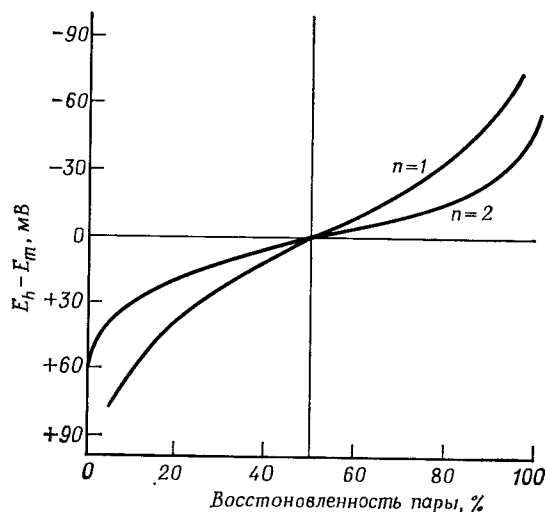


Рис. 3.3. Изменение величины E_h в зависимости от степени восстановления редокс-пары.

$$\Delta G'_0 = -nF\Delta E_h. \quad (3.21)$$

Число Фарадея (F) служит коэффициентом пересчета при переходе от электрических единиц к $\text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (табл. 3.3). Окислительно-восстановительная реакция находится в равновесии, когда $\Delta E_h = 0$.

Величины редокс-потенциалов служат характеристикой окислительно-восстановительных реакций в водной фазе. В случае сопрягающих мембран (разд. 5.3) следует рассматривать

Таблица 3.3

Перевод величин разности редокс-потенциалов в изменения свободной энергии для одно- и двухэлектронного переносов

$\Delta E_h, \text{ мВ}$	$\Delta G', \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	
	$n = 1$	$n = 2$
0	0	0
+100	-9,6	-19,3
+200	-19,3	-38,6
+500	-48,2	-96,5
+1000	-96,5	-193
+1200	-116	-231

систему из трех фаз: двух водных и собственно мембраны. Если на мембране существует разность электрических потенциалов, «электрохимический потенциал электрона» в редокс-паре зависит от величины мембранного потенциала и локализации пары в мембране (Mitchell 1976a, Walz, 1979).

3.4. РАЗНОСТЬ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ИОНОВ

Важнейшим приложением представлений об изменениях свободной энергии в биоэнергетике является описание процессов запасаания энергии в виде градиента ионов (в особенности протонов) на мембране. Движение ионов через заряженную мембрану по градиенту определяется двумя факторами. Один из них — концентрационный градиент ионов. Изменение свободной энергии при переносе 1 моля иона X из раствора с концентрацией $[X]'$ в раствор с концентрацией $[X]''$ в отсутствие разности электрических потенциалов выражается формулой

$$\Delta G = 2,3RT \lg \frac{[X]''}{[X]'} \quad (3.22)$$

Отметим, что это уравнение аналогично тому, которое характеризует неветерные реакции [уравнение (3.4)]. В частности, в обоих случаях 10-кратному отклонению от равновесия соответствует изменение свободной энергии в $5,7 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$.

В том случае, когда 1 моль иона X^{m+} переносится по градиенту электрического потенциала $\Delta\psi$ мВ в отсутствие концентрационного градиента, изменение свободной энергии составляет

$$\Delta G = -mF\Delta\psi. \quad (3.23)$$

В общем случае, когда существуют и электрический, и концентрационный градиенты, перенос одного моля иона X^{m+} по градиенту электрического потенциала $\Delta\psi$ мВ из раствора с концентрацией $[X^{m+}]'$ в раствор с концентрацией $[X^{m+}]''$ сопровождается изменением свободной энергии, равным

$$\Delta G = -mF\Delta\psi + 2,3RT \lg \frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'}. \quad (3.24)$$

Изменения свободной энергии в этом случае обычно представляют в форме разности электрохимических потенциалов $\tilde{\mu}_{X^{m+}}$, выраженной в единицах электрического потенциала:

$$\tilde{\mu}_{X^{m+}} = m\Delta\psi - \frac{2,3RT}{F} \lg \frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'}. \quad (3.25)$$

В частном случае протонного градиента логарифмический фактор равен разности рН (ΔpH), так что

$$\Delta \tilde{\mu}_{H^+} = \Delta \psi - \frac{2,3RT}{F} \Delta pH \quad (3.26)$$

или (при 30°C, в милливольтках)

$$\Delta \tilde{\mu}_{H^+} = \Delta \psi - 60 \Delta pH. \quad (3.27)$$

Хотя уравнение (3.25) наиболее часто используется для описания электрохимических градиентов ионов, в этом виде оно верно лишь для ионов, переносимых через мембрану путем электрогенного унипорта (разд. 2.3). В том случае, когда перенос двух или более ионов прочно сопряжен, необходимо учитывать общую разность электрохимических потенциалов. В качестве примера на рис. 3.4 показаны уравнения разности электрохимических потенциалов ионов Ca^{2+} для трех возможных способов транспорта.

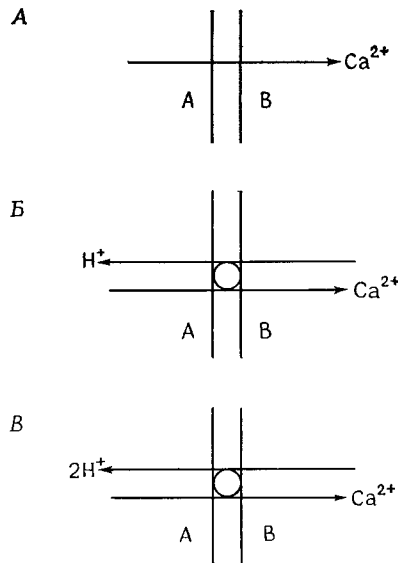


Рис. 3.4. Уравнения электрохимического потенциала Ca^{2+} для различных механизмов его транспорта. А. Унипорт: $\Delta \tilde{\mu}_{Ca^{2+}} = 2\Delta \psi - 60 \lg \frac{[Ca^{2+}]_B}{[Ca^{2+}]_A}$.

Б. Антипорт Ca^{2+}/H^+ : $\Delta \tilde{\mu}'_{Ca^{2+}} = \Delta \psi - 60 \lg \frac{[Ca^{2+}]_B [H^+]_A}{[Ca^{2+}]_A [H^+]_B}$.

В. Антипорт $Ca^{2+}/2H^+$: $\Delta \tilde{\mu}''_{Ca^{2+}} = -60 \lg \frac{[Ca^{2+}]_B [H^+]_A^2}{[Ca^{2+}]_A [H^+]_B^2}$.

3.5. РАВНОВЕСНЫЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ; СЛАБЫЕ КИСЛОТЫ И СЛАБЫЕ ОСНОВАНИЯ

Как и в случае всякого другого равновесия, равновесное распределение ионов на мембране достигается, когда ΔG равно нулю и, следовательно, $\Delta \tilde{\mu}_{X^{m+}} = 0$. В этих условиях уравнение электрохимического градиента принимает следующий вид:

$$\Delta \tilde{\mu}_{X^{m+}} = 0 = m\Delta \psi - 2,3 \frac{RT}{F} \lg \frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'}. \quad (3.28)$$

Это уравнение легко преобразовать в уравнение Нернста:

$$\Delta \psi = 2,3 \frac{RT}{mF} \lg \frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'}. \quad (3.29)$$

Таким образом, равновесное распределение иона может достигаться без уравнивания его концентраций по разные стороны мембраны. Напротив, разность электрических потенциалов на мембране может существовать даже в том случае, если протоны находятся в электрохимическом равновесии.

Мембранный потенциал является обобщенной характеристикой всякой мембраны. Следовательно, генерация мембранного потенциала при переносе какого-нибудь иона сказывается на электрохимическом равновесном распределении всех других ионов на данной мембране. Мембранный потенциал, образующийся при переносе протонов, можно измерить с помощью других ионов. Если какой-то ион проникает через мембрану по механизму электрогенного унипорта, то после установления равновесия потенциал на мембране можно определить по распределению этого иона на основании уравнения (3.29). Этот принцип лежит в основе большинства методов измерения $\Delta \psi$ в органеллах (разд. 4.2). Изменение равновесного распределения иона в зависимости от $\Delta \psi$ показано на рис. 3.5.

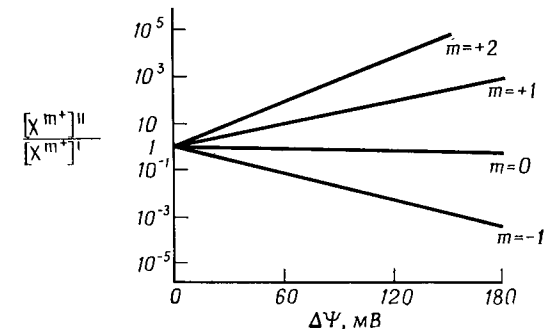


Рис. 3.5. Равновесное распределение иона X^{m+} как функция мембранного потенциала и переносимого заряда при транспорте по механизму унипорта.

Распределение незаряженных веществ не зависит от $\Delta\psi$ и достигает равновесия, когда градиент концентрации становится равен нулю. Слабые кислоты и основания (те, что имеют pK' между 3 и 11) часто способны проникать в незаряженной фор-

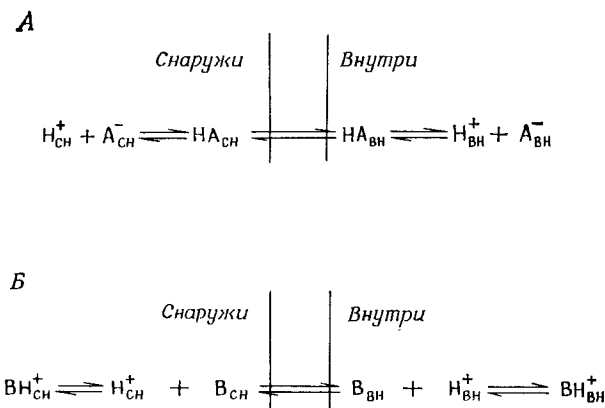


Рис. 3.6. Равновесное распределение слабых кислот и слабых оснований, проникающих через мембрану в незаряженной форме, как функция ΔpH . А. Слабые кислоты. Если pK кислоты по обе стороны мембраны совпадают, то

$$K = \frac{[H^+]_{сн}[A^-]_{сн}}{[HA]_{сн}} = \frac{[H^+]_{вн}[A^-]_{вн}}{[HA]_{вн}}.$$

При равновесии $[HA]_{сн} = [HA]_{вн}$; следовательно, $[H^+]_{вн}/[H^+]_{сн} = [A^-]_{сн}/[A^-]_{вн}$. Б. Слабые основания:

$$K = \frac{[H^+]_{сн}[B]_{сн}}{[BH^+]_{сн}} = \frac{[H^+]_{вн}[B]_{вн}}{[BH^+]_{вн}}.$$

При равновесии $[B]_{сн} = [B]_{вн}$; следовательно,

$$[H^+]_{вн}/[H^+]_{сн} = [BH^+]_{вн}/[BH^+]_{сн}.$$

Обозначения: сн — снаружи, вн — внутри.

ме через бислойные участки мембран (разд. 2.4). В то же время ионизованные формы этих веществ не проникают через мембрану, даже если присутствуют в большом избытке по сравнению с незаряженной формой. Хотя распределение нейтральных форм (протонированной кислоты или депротонированного основания) не зависит от $\Delta\psi$, но в том случае, если на мембране существует градиент pH , концентрации ионизованных форм, согласно уравнению Гендерсона — Хассельбаха, должны быть различны по обе стороны мембраны, тогда как концентрации незаряженных форм одинаковы (рис. 3.6). Таким образом, анионы слабых кислот должны концентрироваться в отсеке с низким pH , а протонированные формы оснований — в отсеке с высоким pH . Этот принцип широко используется при определении величин ΔpH на сопрягающих мембранах (разд. 4.2).

3.6. МЕМБРАННЫЙ, ДИФфуЗИОННЫЙ, ДОННАНОВСКИЙ И ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛЫ

Существуют три различных способа, с помощью которых может быть создан истинный мембранный потенциал (т. е. трансмембранная разность электрических потенциалов). Во-первых, он может возникать при работе электрогенных ионных помп, как это происходит в сопрягающих мембранах. Во-вторых, если по одну сторону мембраны добавить соль, катион и анион которой с разной скоростью проникают через мембрану, то благодаря именно этой разности скоростей возникает диффузионный потенциал. Диффузионный потенциал можно создать на сопрягающей мембране, например добавив K^+ в присутствии валиномицина (рис. 4.7). На сопрягающих мембранах органелл диффузионные потенциалы быстро рассеиваются благодаря движению противоионов. В случае плазматической мембраны эукариотической клетки, где транспортные процессы в основном происходят медленно, такие потенциалы могут существовать часами.

Предельным случаем диффузионного потенциала является вариант, когда мембрана совершенно непроницаема для противоина. Эти условия создаются во многих органеллах благодаря «фиксированным» отрицательным зарядам внутренних белков и фосфолипидов. В результате если органеллы суспендировать в среде с низкой ионной силой, то наиболее подвижные катионы будут выходить наружу до тех пор, пока возникший потенциал не уравнивается с градиентом их концентрации. Этот стабильный потенциал называют доннановским.

Как доннановский, так и диффузионный потенциал является истинной разностью потенциалов между водными фазами по разные стороны мембраны; они могут быть измерены соответствующими методами. Необходимо, однако, помнить, что $\Delta\psi$ является лишь одним из компонентов $\Delta\mu_{H^+}$, иначе могут возникнуть недоразумения (Tedeschi, 1979). Так, например, если митохондрии суспендировать в сахарозной среде в присутствии валиномицина (разд. 2.5) и FCCP (разд. 2.5), то на мембране поддерживается стабильный доннановский $\Delta\psi$ более 80 мВ, хотя $\Delta\mu_{H^+}$ равен нулю, так как $\Delta\psi$ скомпенсирован равным градиентом pH (кислота в матриксе) (Nicholls, 1974). В присутствии субстрата и в отсутствие FCCP $\Delta\psi$ возрастает лишь до 150 мВ, а $\Delta\mu_{H^+}$ при этом растет от 0 до 230 мВ. Таким образом, при обсуждении хемиосмотической гипотезы вопрос о том, насколько $\Delta\psi$ зависит от метаболизма (Tedeschi, 1979), не имеет особого значения, тогда как вопрос о зависимости от метаболизма суммарного $\Delta\mu_{H^+}$ является решающим.

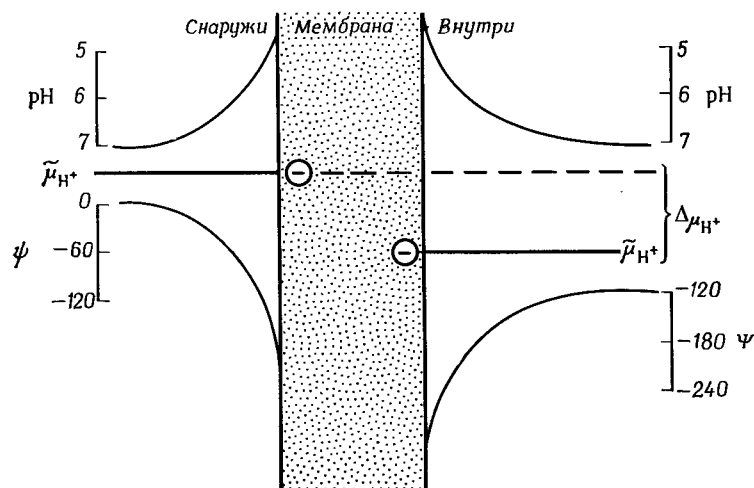


Рис. 3.7. Влияние поверхностных зарядов на профиль мембранного потенциала, ΔpH и $\Delta \mu_{H^+}$ вблизи мембраны. Отметим, что, хотя и $\Delta \psi$, и ΔpH меняются вблизи мембраны, суммарная величина электрохимического протонного потенциала не зависит от поверхностного заряда. Это означает, что протоны, связанные с поверхностью мембраны или локализованные вблизи нее, находятся в электрохимическом равновесии с протонами в водной фазе (Junge, 1977).

Поверхностные потенциалы существенно отличаются от тех, что были рассмотрены выше. Наличие фиксированных отрицательных зарядов на поверхности сопрягающих мембран приводит к тому, что концентрация протонов в непосредственной близости от мембраны оказывается выше, чем вдали от нее (рис. 3.7). Разность электрохимических потенциалов протонов на мембране $\Delta \mu_{H^+}$ не зависит от поверхностных потенциалов, поскольку повышение концентрации протонов у поверхности компенсируется снижением электрического потенциала. В то же время некоторые мембранные индикаторы $\Delta \psi$, такие, как каротиноиды в фотосинтетических мембранах (разд. 6.3), реагируют также на величину поверхностных потенциалов.

3.7. ФОТОНЫ

В системах фотосинтеза первичным источником свободной энергии являются кванты электромагнитной энергии, или фотоны, которые поглощаются фотосинтетическими пигментами. Энергия одного фотона равна $h\nu$, где h — это постоянная Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с), а ν — частота излучения (s^{-1}). Если один фотон взаимодействует с одной молекулой, то N фотонов, где

N — число Авогадро, взаимодействует с одним молем. Энергия одного моля (1 эйнштейна) фотонов составляет

$$E = Nh\nu = Nh c / \lambda = 120\,000 / \lambda \text{ кДж} \cdot \text{эйнштейн}^{-1}, \quad (3.30)$$

где c — это скорость света, а λ — длина волны в нм. Из данных на рис. 3.8 видно, что поглощение лишь одного эйнштейна красного света (600 нм) позволяет использовать около 200 кДж·моль⁻¹, что вполне сопоставимо с изменениями свободной энергии при биоэнергетических процессах.

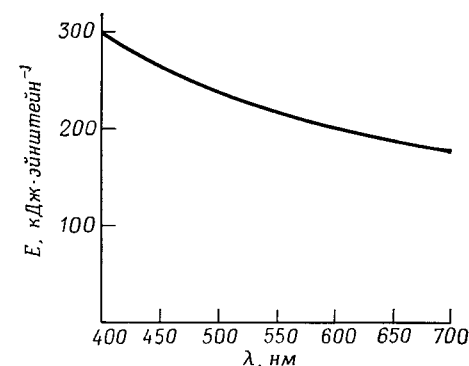


Рис. 3.8. Энергия фотонов, выраженная в эйнштейнах, как функция длины волны.

3.8. ПРЕВРАЩЕНИЯ ЭНЕРГИИ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Важнейшие стадии хемиосмотического сопряжения включают взаимопревращения различных форм свободной энергии, описанных в предыдущих разделах. Некоторые из наиболее важных процессов рассмотрены в табл. 3.4. Равновесная термодинамика позволяет ответить на следующие вопросы: 1. Находится ли данный процесс превращения энергии в равновесии ($\Delta G = 0$)? 2. В каком направлении будет идти этот процесс? 3. Какова стехиометрия этого процесса (постольку, поскольку ее можно рассчитать, зная, что равновесие достигнуто и $\Delta G = 0$)?

Таблица 3.4

Равновесные условия для некоторых хемиосмотических преобразователей энергии

а) Редокс-зависимая протонная помпа

$$2\Delta E_h = n\Delta \mu_{H^+},$$

где n равняется стехиометрии $H^+/2e^-$ для данного участка цепи. Отметим, что это уравнение верно лишь в том случае, если обе редокс-пары, образующие этот участок, находятся по одну сторону мембраны (Walz, 1979).

б) АТФ-синтаза

$$\Delta G_P (\text{внутри}) = n' \Delta \mu_{H^+},$$

$$\Delta G_P (\text{снаружи}) = (n' + 1) \Delta \mu_{H^+},$$

где n' — это стехиометрия H^+/ATP , $\Delta G_P (\text{внутри})$ — фосфатный потенциал в матриксе митохондрий, $\Delta G_P (\text{снаружи})$ — фосфатный потенциал во внемитохондриальной среде; разность между ними определяется транспортом адениновых нуклеотидов и P_i через внутреннюю мембрану (разд. 7.6).

Далее, как будет показано ниже (разд. 3.9), параметры равновесной термодинамики с некоторыми ограничениями могут быть использованы в рамках неравновесной термодинамики для описания процессов, протекающих вблизи равновесия, так как потоки энергии при этом являются такими функциями отклонения от равновесия, что их можно рассчитать на основании равновесных величин.

Для того чтобы рассчитать суммарное изменение свободной энергии для данного процесса превращения энергии, необходимо выразить все компоненты в одних и тех же единицах. Хотя наиболее фундаментальными единицами являются кДж·моль⁻¹, величины редокс-потенциалов и электрохимических потенциалов удобнее выражать в единицах электрического потенциала. Перевод единиц измерения свободной энергии в электрические единицы достигается путем деления на число Фарадея:

$$\Delta G/F = \Delta G^0/F + 2,3RT/F \lg \Gamma' \quad (3.31)$$

Так, отклонению отношения действующих масс от равновесия на порядок [уравнение (3.4)] соответствует изменение свободной энергии 5,7 кДж·моль⁻¹ или 59 мВ. В табл. 3.4 приведены условия равновесия для некоторых процессов превращения энергии.

Биоэнергетические системы *in vivo* являются открытыми. В экспериментах с изолированными органеллами часто оказывается возможным создать условия равновесного превращения одной формы энергии в другую, если заингибировать последующие стадии процесса. Например, в изолированных митохондриях может устанавливаться равновесие между $\Delta\mu_{H^+}$ и ΔG_P (АТР/АДР + Р_i), если в системе отсутствуют любые немитохондриальные АТР-азы. В этих условиях можно рассчитывать термодинамическую стехиометрию процесса (разд. 4.4).

3.9. ПРИЛОЖЕНИЯ НЕРАВНОВЕСНОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ

(Обзоры: Rottenberg, 1979b, Westerhoff, van Dam, 1979)

Классическая равновесная термодинамика способна предсказывать условия, в которых данный процесс превращения энергии достигнет равновесия, а также направление, но не скорость протекания процессов, возникающих при отклонении от равновесия. Неравновесная (или необратимая) термодинамика содержит значительно меньше ограничений: она позволяет установить связь между потоками энергии и степенью отклонения системы от равновесия. Уравнения неравновесной термодинамики могут быть использованы для описания взаимосвязанных процессов переноса электронов, транслокации протонов и синтеза АТР в терминах потоков и потенциалов. Этот подход поз-

воляет описать ток электронов в электрической цепи и показать, что протонный цикл (разд. 4.1) описывается аналогично для случая одномерного тока протонов.

Описание формальных подходов неравновесной термодинамики выходит за рамки настоящей книги, однако важно отметить те области, где эти подходы могут быть использованы.

В условиях, близких к равновесию, величина потока J есть функция A — сродства или разности свободных энергий. Вблизи равновесия эти параметры связаны линейной зависимостью:

$$J = L \cdot A,$$

где L — коэффициент пропорциональности. В случае транспорта ионов через мембрану, например если он происходит по механизму простого унипорта, сродство (A) эквивалентно разности электрохимических потенциалов (выраженной в тех же единицах, что и сродство):

$$J = L \cdot \Delta\tilde{\mu},$$

Так, в случае утечки протонов, катализируемой протонофором,

$$J_{H^+} = L_{H^+} \cdot \Delta\tilde{\mu}_{H^+},$$

т. е. поток протонов линейно зависит от величины $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Это уравнение остается справедливым даже в случае значительных отклонений от положения равновесия для диффузионных процессов, но не для химических реакций.

Для прочно сопряженного симпорта двух веществ через мембрану

$$J_B^A = L (\Delta\tilde{\mu}_A + \Delta\tilde{\mu}_B).$$

Так, например, для симпорта лактозы с протоном, катализируемого лактозным переносчиком в *E. coli* (разд. 8.5),

$$J_{\text{лакт}}^{H^+} = L (\Delta\tilde{\mu}_{\text{лакт}} + \Delta\tilde{\mu}_{H^+}).$$

Это означает, что лактоза будет транспортироваться против градиента своего электрохимического потенциала до тех пор, пока существует $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ достаточной величины.

Для ионной помпы со стехиометрией n , например для АТР-синтетазы, связь потоков ионов и субстрата выражается следующими уравнениями:

$$J_{\text{АТР}} = L_{\text{АТР}} (A_{\text{АТР}} + n\Delta\tilde{\mu}_{H^+}),$$

$$J_{H^+} = nJ_{\text{АТР}}.$$

ХЕМИОСМОТИЧЕСКИЙ ПРОТОННЫЙ ЦИКЛ

4.1. ВВЕДЕНИЕ

Протонный цикл, включающий работу первичных генераторов $\Delta\mu_{H^+}$ и АТФ-синтазы, был рассмотрен в гл. 1. В этой главе мы обсудим функционирование протонного цикла в различных системах хемиосмотического сопряжения, которые могут быть созданы *in vitro*. Особо мы остановимся на сходстве протонных циклов с эквивалентными электрическими цепями (рис. 1.3), которые не только служат удобной моделью, но опи-

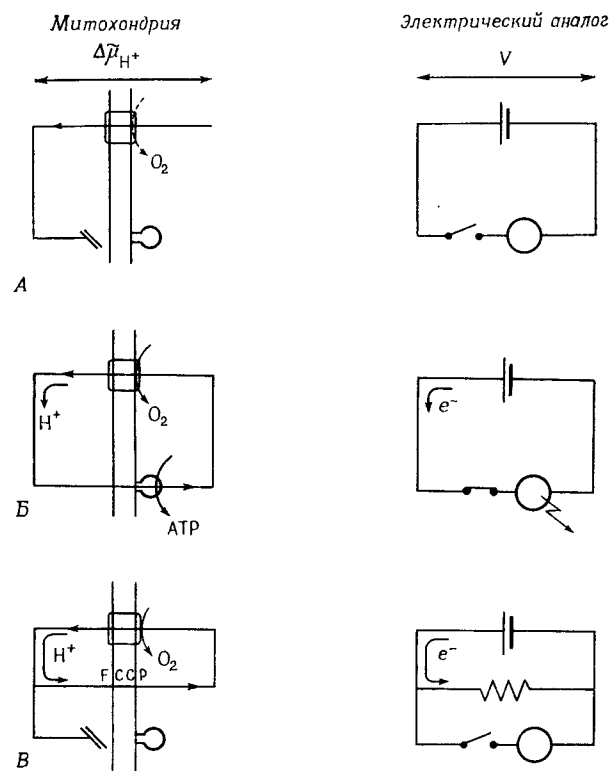


Рис. 4.1. Аналогия между протонным циклом в митохондриях и электрической цепью. А. Разомкнутая цепь. Ток равен нулю (дыхания нет). Потенциал ($\Delta\mu_{H^+}$) максимален. Б. Цепь замкнута. Ток течет (дыхание есть). Совершается полезная работа (синтезируется АТФ). Потенциал ($\Delta\mu_{H^+}$) ниже максимального. В. Цепь замкнута накоротко. Энергия рассеивается, потенциал низок, а ток (дыхание) велик.

сываются теми же уравнениями для потоков переноса энергии, что и протонные циклы (разд. 3.9).

Электрическая цепь характеризуется двумя основными параметрами: разностью потенциалов (в вольтах) и силой тока (в амперах). Измерив эти величины, можно рассчитать и другие параметры, такие, как уровень передачи энергии (в ваттах) или сопротивление компонентов цепи (в омах). На рис. 4.1 показана простая электрическая цепь, а также аналогичный протонный цикл во внутренней мембране митохондрий (цикл, существующий в фотосинтетической мембране, практически не отличается от изображенного на рис. 4.1). В разомкнутой цепи (рис. 4.1, А) электрический потенциал максимальный, но ток не течет, поскольку разность редокс-потенциалов, создаваемая батареей, точно уравновешивается разностью электрических потенциалов. В силу того что окислительно-восстановительные реакции в батарее прочно сопряжены с переносом электронов, в этих условиях химических реакций не происходит. В случае митохондрий протонный цикл оказывается разомкнутым, если протоны, выброшенные при работе дыхательной цепи, не могут вновь вернуться в матрикс. Как и в случае электрической цепи, мембранный потенциал в этих условиях максимальный и разность редокс-потенциалов в протонтранспортирующих участках дыхательной цепи (разд. 5.3) находится в равновесии с разностью электрохимических потенциалов протонов [с учетом стехиометрии H^+/e^- (разд. 3.8)]. Если редокс-реакции жестко сопряжены с переносом протонов, то в этих условиях дыхания не происходит.

На рис. 4.1, Б показаны нормальные режимы работы электрического и протонного циклов, в которых совершается полезная работа. Потенциал в этих условиях несколько ниже, чем при разомкнутой цепи. Движущей силой служит небольшая разница между редокс-потенциалом дыхательной цепи (батареи) и потенциалом электрической цепи. Можно рассчитать «внутреннее сопротивление» батареи, исходя из падения потенциала, необходимого для поддержания данного тока. Так было определено «внутреннее сопротивление» дыхательной цепи, которое оказалось очень низким (разд. 4.5).

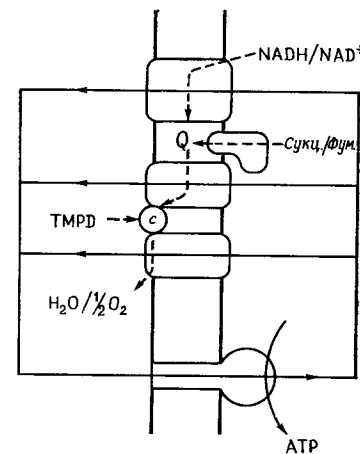


Рис. 4.2. Митохондриальная дыхательная цепь содержит три протонные помпы, которые включены в протонный цикл параллельно, а относительно потока электронов — последовательно. Сукц. — сукцинат, фум. — фумарат.

Электрическая цепь может быть замкнута накоротко, если параллельно с ней ввести цепь с малым сопротивлением (рис. 4.1. В). Ток в этом случае течет, не совершая полезной работы, а энергия рассеивается в виде тепла. В случае протонного цикла разобщение происходит после добавления протонофоров (разд. 2.4). Дыхание при этом не сопровождается стехиометрическим синтезом АТР.

Конечно, было бы слишком большим упрощением рассматривать дыхательную цепь как единый генератор протонного тока. Система дыхательной цепи состоит из трех протонных помп, включенных в протонный цикл параллельно, но работающих последовательно по отношению к току электронов (рис. 4.2). Подробному обсуждению работы дыхательной цепи будет посвящена гл. 5. Здесь же мы рассмотрим комплексы дыхательной цепи в основном как «черные ящики». Надо лишь отметить, что существует возможность подавать и принимать электроны на уровне каждой из протонных помп, что позволяет исследовать их раздельно.

4.2. ИЗМЕРЕНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОТОНОВ

(Обзоры: Rottenberg, 1975, 1979a; Fillingame, 1980)

Количественное определение протонного электрохимического потенциала имело большое значение для хемиосмотической теории, поскольку всякий эксперимент, в котором наблюдался бы синтез АТР в отсутствие достаточного по величине $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, мог бы подорвать основы теории. Протонный электрохимический потенциал является также наиболее прямым и количественным показателем «энергизованного» состояния сопрягающей мембраны в органеллах.

Все существующие методы измерения $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ включают раздельное определение величины $\Delta\psi$ и ΔpH (разд. 3.5). $\Delta\psi$ можно рассчитать по уравнению Нернста [уравнение (3.30)], определив равновесный концентрационный градиент какого-нибудь иона, проникающего через мембрану, если мембрана непроницаема для других ионов, присутствующих в среде (разд. 2.3). Можно также использовать спектральные индикаторы $\Delta\psi$, предварительно откалибровав их с помощью заданных диффузионных потенциалов (разд. 3.6). ΔpH обычно рассчитывают на основании равновесного распределения нейтральных проникающих форм слабых кислот и оснований (разд. 3.5).

Особенно осторожно следует подходить к выбору индикато-

ров. Во-первых, для измерения $\Delta\psi$ должен быть выбран ион, который будет накапливаться внутри везикул: катион, если внутри органеллы (митохондрии) «минус», или анион, если внутри «плюс» (субмитохондриальные частицы, хроматофоры, хлоропласты). Во-вторых, должна существовать возможность расчета концентрации свободного индикатора внутри органеллы. Следует выбирать либо такой индикатор, который не связывается с компонентами органеллы, либо индикатор, позволяющий легко рассчитать коэффициент его активности. В-третьих, индикатор должен быстро перераспределяться между средой и внутривезикулярным пространством, достигая электрохимического равновесия, причем желательно, чтобы перенос индикатора через мембрану осуществлялся по какому-то одному механизму. В-четвертых, индикатор должен в минимальной степени изменять электрохимические градиенты. В-пятых, индикатор не должен метаболизироваться.

В случае измерений ΔpH к индикатору предъявляются те же требования. К тому же индикатор должен быть слабой кислотой, чтобы накапливаться внутри органеллы, имеющей внутри щелочной pH , и слабым основанием, если внутри кислый pH (разд. 3.5).

После того как достигнуто равновесное распределение индикатора, его концентрацию необходимо измерить. Это достигается, например, при быстром отделении органелл от среды или при непрерывном измерении падения концентрации индикатора в среде по мере его накопления в органелле. В некоторых случаях удастся использовать изменение спектральных свойств индикаторов при их накоплении в органеллах. Далее мы рассмотрим примеры использования этих подходов.

4.2.1. ИЗМЕРЕНИЕ $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ С ПОМОЩЬЮ ИОНСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

(Обзоры: Rottenberg, 1975, 1979a, Skulachev, 1979)

При первом измерении $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ в митохондриях (Mitchell, Moyle, 1969a) были использованы селективные pH - и K^+ -электроды в анаэробных условиях (рис. 4.3). В среде присутствовал валиномицин, обеспечивающий электрофоретический унипорт K^+ , и $\Delta\psi$ измеряли по количеству K^+ , вошедшего в митохондрии после добавки небольшого количества O_2 . ΔpH определяли по параллельному выбросу протонов. Была получена величина $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, равная 228 мВ и характеризующая «разомкнутую цепь», так как синтеза АТР не происходит (состояние 4 в табл. 4.1).

Сходный метод был разработан в лабораториях В. П. Скулачева и Е. А. Либермана для измерения $\Delta\psi$ в различных ор-

ганеллах. Вместо K^+ и валиномицина были синтезированы катионы и анионы, заряд которых был делокализован и экранирован гидрофобными группами, так что они могли в заряженной форме проникать через бислойные участки мембраны (разд. 2.5). В оригинальной методике измерение падения концентрации иона при его накоплении в органелле проводилось с помощью плоской бислойной липидной мембраны (разд. 1.3), разделяющей ячейку на два отсека: второй отсек содержал тот же про-

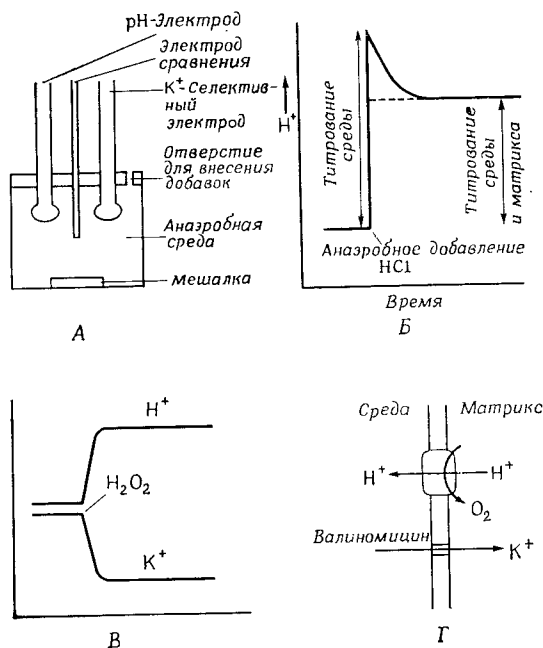


Рис. 4.3. Определение $\Delta\psi$ и ΔpH с помощью ионселективных электродов. А. Прибор. Б. Определение буферной емкости матрикса. В. Эксперимент. Г. Ионные потоки. Митохондрии инкубируют в анаэробных условиях, среда содержит сахарозу, субстрат, валиномицин и K^+ в низкой концентрации. Затем добавляют такое количество H_2O_2 , которое позволяет дыхательной цепи работать около 3 мин (среда содержит каталазу). При этом наблюдается выброс протонов (измеряется рН-электродом) и захват ионов K^+ (измеряется K^+ -селективным электродом). Распределение ионов K^+ в присутствии валиномицина подчиняется уравнению Нерста. Зная объем матрикса, в котором накапливается K^+ , и измерив падение концентрации K^+ в среде, можно рассчитать величину градиента K^+ на мембране. Чтобы рассчитать величину ΔpH , необходимо знать как падение внешнего рН, так и повышение рН в матриксе, а для этого необходимо измерить его буферную емкость. Эту величину определяют в независимом эксперименте, где измеряют закисление среды после анаэробной добавки HCl. Наблюдаемое начальное закисление соответствует буферной емкости среды. Затем происходит частичное защелачивание, связанное с входом протонов в матрикс. Конечное состояние отражает суммарную буферную емкость среды и матрикса.

Таблица 4.1

Состояния дыхания¹⁾

				Дыхание
Состояние 1	Митохондрии	Без субстрата	Нет ADP	Низкое
Состояние 2	»	То же	ADP	»
Состояние 3	»	Субстрат	»	Высокое
Состояние 4	»	»	ADP исчерпан	Низкое
Состояние 5	»	»	Кислород исчерпан	»

Состояние 3 можно подразделить на:

Состояние 3_{разобщ}: высокая скорость дыхания достигается благодаря добавлению протонофораСостояние 3_{ADP}: высокая скорость дыхания достигается благодаря добавлению ADPСостояние 3 $\frac{1}{2}$: промежуточное состояние, когда скорость дыхания определяется скоростью образования ADP (физиологическое)Состоянием 6 называют состояние подавленного дыхания, которое иногда наблюдается при возникновении большого ΔpH в результате накопления Ca^{2+} в отсутствие проникающего аниона.

¹⁾ Первоначальная классификация состояний дыхания (Chance, Williams, 1956) соответствовала последовательности добавок при измерении дыхания с помощью кислородного электрода, как показано на рис. 4.17.

никающий ион, но не содержал энергизованных органелл. Разница в концентрации ионов между отсеками создавала на искусственной мембране потенциал, который измерялся электродами. Мембрана, таким образом, работала как ионселективный электрод. Этот метод позволял свести к минимуму снижение потенциала, которое наблюдалось в опытах с K^+ и валиномицином, так как в матриксе содержится до 100 мМ K^+ (см. ниже). Опыты с синтетическими ионами исключали также возможность участия специфических ионных помп, использующих энергию химического интермедиата (разд. 1.4).

Многие из этих ионов в настоящее время выпускаются в виде радиоактивных изотопов, и их можно использовать для измерений $\Delta\psi$ с помощью изотопной техники.

4.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ $\Delta\psi$ И ΔpH ПО РАСПРЕДЕЛЕНИЮ МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(Обзоры: Nicholls, 1974; Rottenberg, 1975, 1979; Ramos et al. 1979)

Определение $\Delta\psi$ и ΔpH по равновесному распределению меченых соединений можно проводить без отделения органелл от среды инкубации с помощью метода проточного диализа

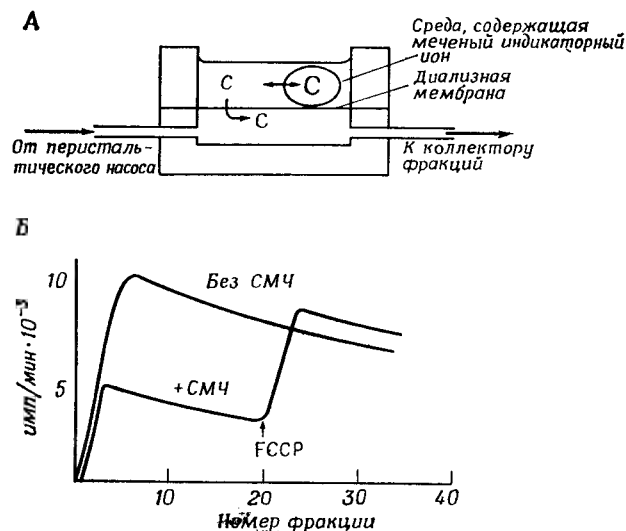


Рис. 4.4. Определение $\Delta\psi$ в субмитохондриальных частицах методом проточного диализа (Sorgato et al., 1978). В верхнем отсеке диализной ячейки (А) содержится: 20 мкмоль/л ^{14}CNS (проникающий анион); NAD^+ , этанол и алкогольдегидрогеназа (образующие NADH -регенерирующую систему, которая поддерживает постоянную концентрацию субстрата); ацетат, который предотвращает образование ΔpH . Там, где указано (Б), добавляются субмитохондриальные частицы (СМЧ). При накоплении ^{14}CNS в СМЧ концентрация изотопа в среде понижается, что приводит к строго пропорциональному снижению скорости его диффузии через диализную мембрану. При добавлении FCCP $\Delta\psi$ рассеивается, что приводит к выходу изотопа из СМЧ и повышению скорости его диффузии через диализную мембрану.

(рис. 4.4). Концентрацию индикаторного вещества при этом измеряют по скорости его диффузии через полупроницаемую мембрану в отсек, через который протекает та же среда. Однако этот метод имеет те же ограничения по чувствительности, что и методы измерения концентраций с помощью электродов. Действительно, в большинстве случаев внутренний объем органелл примерно на три порядка меньше, чем объем среды. В этих условиях метод, который позволяет определять концентрации веществ непосредственно внутри органелл, будет иметь гораздо более высокую чувствительность, чем измерения падения концентрации в среде, даже с учетом трудностей, возникающих при отделении органелл.

Методика разделения должна быть достаточно быстрой, чтобы исключить артефакты, связанные с перераспределением индикаторов в процессе разделения. В методике должно учитываться также остаточное загрязнение органелл средой инкубации. Наиболее широко применяются два метода разделения: центрифугирование через силиконовое масло (рис. 4.5) и филь-

Таблица 4.2

Некоторые величины протонного электрохимического потенциала на сопрягающих мембранах

Объект	Условия	Метод	$\Delta\psi$	$-60 \Delta\text{pH}$	$\sim \Delta\mu\text{H}^+$	Источник данных
Митохондрии (печень)	Состояние 4	Ионселективные электроды	168	48	216	Mitchell, Moyle, 1969
Митохондрии (бурый жир)	Протонный канал открыт	Распределение изотопов ^{86}Rb ^{14}C -метиламина и ^3H -ацетата (фильтрование)	79	-25	54	Nicholls, 1979
Субмитохондриальные частицы (сердце)	Протонный канал блокирован	Распределение изотопов ^{14}CNS и ^{14}C -метиламина (проточный диализ)	134	+95	229	Sorgato et al., 1978
Клетки <i>E. coli</i>	Субстрат- NADH	Поглощение тетрафенилфосфония ($\Delta\psi$) и DMO (ΔpH) (проточный диализ)	145	0	145	Zilberstein et al., 1979
Хлоропласты	Дыхание	ΔpH по тушению флуоресценции 9-аминоакридина; $\Delta\psi=0$	100	+105	205	Rottenberg et al., 1972
Хромопласты	Свет		0	180	180	Schuldiner et al., 1974
Хромопласты	Темнота		12	65	78	
Хромопласты	Свет		89	106	195	

трация через миллипоровые фильтры. Оба они имеют свои преимущества и недостатки. Центрифугирование через масло — более точный метод (при его использовании меньше загрязнение средой инкубации), но он требует большего времени для разделения. Фильтрация менее точна (ее ограничения связаны с ко-

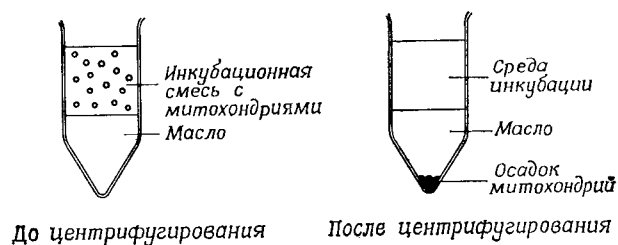


Рис. 4.5. Определение $\Delta\psi$ с помощью центрифугирования митохондрий через силиконовое масло. Митохондрии инкубируют в среде, не содержащей K^+ , в присутствии валиномицина, $^{86}Rb^+$, ^{14}C -сахарозы и 3H_2O . Аликвоту суспензии помещают в небольшую пробирку, содержащую силиконовое масло, и центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин. Митохондрии образуют под слоем масла осадок, который можно затем растворить для жидкостно-сцинтилляционного счета. Определяют также радиоактивность в надосадочной жидкости. Наличие в среде ^{14}C -сахарозы позволяет определить доступный для сахарозы объем в осадке ($V_{сах}$). Он соответствует загрязнению осадка внемитохондриальной средой инкубации. Разность между объемом, доступным для 3H_2O (V_B), и $V_{сах}$ дает величину объема, недоступного для сахарозы, который соответствует объему матрикса (так как через внутреннюю мембрану проникает не сахароза, а вода). Если теперь определить в осадке кажущуюся величину объема, доступного для ^{86}Rb (V_{Rb}), то по уравнению Нернста можно рассчитать мембранный потенциал $\Delta\psi = 59 \lg \frac{(V_{Rb} - V_{сах})}{(V_B - V_{сах})}$.

личеством материала, который можно отфильтровать, и большим объемом промывающей среды), но зато это более быстрый и простой метод. В обоих случаях среда инкубации должна содержать непроникающее меченое вещество, по которому судят о загрязнении органелл средой. В табл. 4.2 приведены некоторые комбинации изотопов, которые применяются для измерения $\Delta\psi$ и ΔpH .

4.2.3. СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИНДИКАТОРЫ $\Delta\psi$ И ΔpH

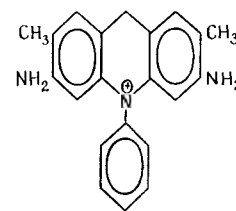
(Обзоры: Waggoner, 1976; Bashford, Smith, 1979)

Если на сопрягающей мембране существует мембранный потенциал ($\Delta\psi$) около 200 мВ, то напряженность электрического поля в мембране превышает $300\,000\text{ В}\cdot\text{см}^{-1}$. Неудивительно поэтому, что при генерации $\Delta\psi$ некоторые природные компоненты мембран изменяют свои спектральные свойства. Такой электро-

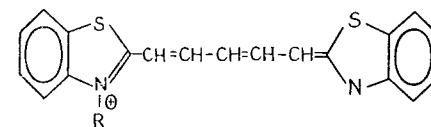
хромизм определяется изменением энергетических уровней электронов в молекуле под действием внешнего электрического поля. Наиболее широко из природных индикаторов $\Delta\psi$ изучены пигменты, в частности каротиноиды в сопрягающих фотосинтетических мембранах (разд. 6.3). Электрохромный сдвиг развивается очень быстро (в течение наносекунд или менее), что позволяет исследовать первичные электрогенные реакции при поглощении света (разд. 6.2). Существует, однако, одно важное ограничение при использовании этого подхода. Мембранные пигменты способны реагировать лишь на те электрические поля, которые возникают в непосредственной близости от них. Величины этих полей могут не соответствовать разности потенциалов между водными фазами, измеряемой, например, по распределению ионов. Большое влияние на величину измеряемого электрохромного ответа оказывает, по-видимому, поверхностный потенциал (разд. 3.6).

Существуют также искусственные спектральные индикаторы $\Delta\psi$ и ΔpH . Некоторые примеры таких молекул, используемых в экспериментах, показаны на рис. 4.6. Пока не описано ни одного искусственного индикатора $\Delta\psi$, который работал бы аналогично каротиноидам, т. е. оставался бы фиксированным в мембране и менял бы спектральные свойства при создании поля. Хо-

А. Катионные
Феносафранин



Цианиновые красители, например



Б. Анионные
Оксонолы, например

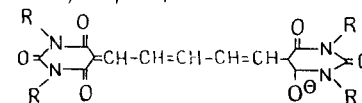


Рис. 4.6. Некоторые спектральные индикаторы мембранного потенциала.

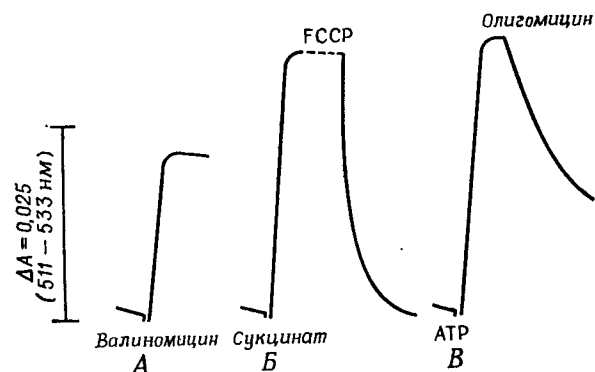


Рис. 4.7. Сафранин как индикатор $\Delta\psi$ в митохондриях (Akerman, Wikström, 1976). Митохондрии из клеток печени инкубировали в присутствии ротенона, блокирующего дыхание (разд. 5.6). А. Кривая показывает образование диффузионного потенциала величиной 124 мВ после добавления валиномицина. Концентрация K^+ в среде составляла 0,96 мМ, а в матриксе принималась равной 120 мМ. Б. Образование $\Delta\psi$ было вызвано добавлением субстрата дыхания — сукцината, а рассеивание — добавлением протонофора. В. $\Delta\psi$ был образован благодаря гидролизу АТФ и снят после добавления ингибитора АТФ-синтетазы — олигомицина (разд. 7.2). Среда инкубации содержала 10 мкМ сафранина. Измерения проводились на двухволновом спектрофотометре (разд. 5.2).

ты искусственные индикаторы широко используются для определения $\Delta\psi$ и ΔpH , механизмы их ответов часто еще остаются предметом дискуссий. Общим свойством индикаторов является изменение спектров поглощения (или флуоресценции) при связывании с мембраной или при накоплении внутри органеллы. Это позволяет наблюдать за связыванием или перераспределением индикаторов без отделения органелл от среды инкубации. Многие индикаторы представляют собой большие плоские молекулы, способные к стэкинг-взаимодействиям при повышении их локальной концентрации. При этом понижается их способность поглощать свет, что и лежит в основе, по крайней мере некоторых, спектральных изменений. Сложная природа ответов искусственных индикаторов объясняется тем, что на их величину влияют многие факторы помимо $\Delta\psi$ и ΔpH . Поэтому измерения с помощью индикаторов требуют очень тщательного контроля всех условий эксперимента. Спектральные ответы всегда следует калибровать, например с помощью создания диффузионных потенциалов K^+ в присутствии валиномицина (разд. 3.6; рис. 4.7).

4.2.4. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ ВКЛАД $\Delta\psi$ И ΔpH В $\Delta\mu_{H^+}$

(Обзор: Gromet-Elhanan, 1977)

На рис. 4.8 суммированы различные факторы, регулирующие относительный вклад $\Delta\psi$ и ΔpH в суммарную величину $\Delta\mu_{H^+}$. Если исходить из деэнергизованной органеллы, например митохондрии, то работа протонной помпы (если не учитывать работу всех других митохондриальных систем) приведет к образованию $\Delta\mu_{H^+}$, основным компонентом которого является $\Delta\psi$. В случае митохондрий электрическая емкость мембраны такова, что перенос 1 нмоля H^+ на 1 мг белка приводит к образованию $\Delta\psi$ около 200 мВ. Буферная емкость митохондриального матрикса составляет около 20 нмолей H^+ на 1 мг белка на единицу pH и, следовательно, при потере 1 нмоля H^+ pH матрикса повысится лишь на 0,05 (что соответствует $-\Delta pH = 3$ мВ). Таким образом, $\Delta\mu_{H^+}$ в этих условиях на 99% представлен в форме мембранного потенциала (рис. 4.8, Б).

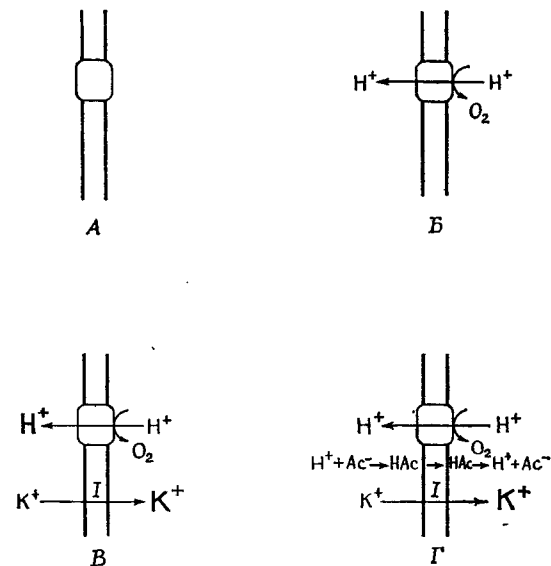


Рис. 4.8. Факторы, контролирующие относительный вклад $\Delta\psi$ и ΔpH в величину $\Delta\mu_{H^+}$. А. Деэнергизованные митохондрии ($\Delta\psi=0$; $-\Delta pH=0$; $\Delta\mu_{H^+}=0$). Б. После включения дыхания $\Delta\psi$ очень высокий, а $-\Delta pH$ очень низкий ($\Delta\mu_{H^+}=220$ мВ). В. В результате образования $\Delta\psi$ начинается электрофоретическое накопление катиона: $\Delta\psi$ снижается, $-\Delta pH$ возрастает и восстанавливается $\Delta\mu_{H^+}=220$ мВ. Г. В ответ на образование ΔpH происходит электронейтральное накопление слабой кислоты; $\Delta\psi$ возрастает, $-\Delta pH$ снижается, сохраняется $\Delta\mu_{H^+}=220$ мВ, может происходить набухание. Ас — ион ацетата, I — валиномицин.

При образовании $\Delta\mu_{H^+}$ может происходить перераспределение проникающих ионов (рис. 4.8, В). Перенос K^+ в присутствии валиномицина или перенос Ca^{2+} (разд. 8.4) приводит к рассеиванию $\Delta\psi$ и, следовательно, понижению $\Delta\mu_{H^+}$. При этом происходит дополнительный выброс протонов дыхательной цепью и повышение ΔpH . Перенос 20 нмоль K^+ (или 10 нмоль Ca^{2+}), уравновешенный выбросом 20 нмоль H^+ , приведет, если учитывать буферную емкость матрикса, к образованию ΔpH около единицы ($-60\Delta pH = 60$ мВ). Поскольку дыхательная цепь может создать лишь $\Delta\mu_{H^+}$, не превышающий исходный, то после переноса ионов конечная величина $\Delta\psi$ снизится на 60 мВ. Таким образом, перенос катионов приводит к перераспределению компонентов $\Delta\mu_{H^+}$: ΔpH растет, $\Delta\psi$ падает. Понижение $\Delta\psi$ в этих условиях будет приводить к снижению уровня переноса ионов, пока система не достигнет электрохимического равновесия [уравнение (3.28)]. Например, накопление Ca^{2+} в митохондриях в обмен на протоны ограничено примерно 20 нмолями Ca^{2+} на 1 мкг белка (разд. 8.4). При этом $\Delta\psi$ снижается (и $-60\Delta pH$ возрастает) на 120 мВ.

Третий фактор, который может влиять на относительный вклад $\Delta\psi$ и ΔpH , — это перераспределение электронейтральных проникающих форм слабых кислот и оснований (рис. 4.8, Г). Например, накопление слабой кислоты в ответ на образование ΔpH , возникшего при переносе катионов, будет приводить к рассеиванию ΔpH и возрастанию $\Delta\psi$ за счет работы дыхательной цепи. Возникает ситуация, когда в митохондриях накапливаются и катионы, и анионы. Если их количество достаточно велико, то это приведет к осмотическому набуханию митохондрий (разд. 2.7). Однако этот эффект не наблюдается, если в митохондриях накапливается Ca^{2+} и P_i . Они образуют осмотически неактивный комплекс, и осмотическое давление в матриксе не повышается (разд. 8.4).

Из сказанного становится ясно, что индикаторы ΔpH и $\Delta\psi$, которые сами являются проникающими ионами, слабыми кислотами или слабыми основаниями, могут изменять величины измеряемых градиентов, если не принять мер предосторожности. Это особенно важно при использовании валиномицина, так как концентрация K^+ в матриксе очень высока и измеряемая величина будет определяться величиной исходного градиента K^+ . Эта опасность значительно меньше в опытах с синтетическими катионами, такими, как $TPMP^+$, которые используются в очень низких концентрациях.

Некоторые примеры характерных величин $\Delta\psi$ и ΔpH для различных сопрягающих мембран приведены в табл. 4.2.

4.3. СТЕХИОМЕТРИЯ ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

(Обзоры: Papa, 1976; Mitchell et al., 1979; Reynafarje et al., 1979; Wikström, Krab, 1980)

Протонный ток, генерируемый дыхательной цепью, нельзя прямо измерить в стационарных условиях, так как при этом потоки протонов, направленные наружу и внутрь, равны. Можно, однако, измерить начальный выброс протонов при быстром включении дыхания, пока обратный поток еще не установился. Добавляя небольшие точно отмеренные порции O_2 к суспензии митохондрий, находящейся в анаэробных условиях в присутствии субстрата дыхания, и измеряя выброс протонов быстро реагирующим рН-электродом, можно определить величины стехиометрии H^+/O для участка дыхательной цепи между данным субстратом и O_2 . Практические детали такого эксперимента приведены на рис. 4.9. Для того чтобы получить точные результаты, необходимо соблюдать ряд предосторожностей. Во-первых, должна существовать катионная проводимость, способная скомпенсировать выброс протонов и предотвратить образование $\Delta\psi$, который бы препятствовал дальнейшему выбросу H^+ (разд. 4.2). Во-вторых, количество добавленного O_2 должно быть настолько мало, чтобы возникающий ΔpH не достигал уровня насыщения. В-третьих, даже при быстром включении дыхания и низкой протонной проводимости какая-то часть протонов успевает вернуться в матрикс (и, следовательно, не будет зарегистрирована), прежде чем завершится начальный всплеск дыхания. Эта опасность возрастает, если в среде присутствует фосфат, который почти всегда есть и в препаратах митохондрий. В митохондриях имеется очень активный переносчик, осуществляющий симпорт H^+/P_i (разд. 7.6). Таким образом, при включении дыхания и образовании ΔpH вместе с протонами в матрикс переносится P_i и измеряемая величина H^+/O занижается. При ингибировании фосфатного переносчика N-этилмаленимидом наблюдаемые величины H^+/O значительно повышаются (Brand et al., 1976, но см. также Moyle, Mitchell, 1978a). Существуют две модификации метода кислородных пульсов. Во-первых, вместо пульсов O_2 можно использовать другие акцепторы электронов, что позволяет исследовать отдельно различные участки дыхательной цепи. В этом случае вместо коэффициента H^+/O используется величина $H^+/2e^-$. Во-вторых, измеряя транспорт K^+ , вместо стехиометрии переноса протонов можно определять стехиометрию переноса зарядов (q^+/O или $q^+/2e^-$). Даже в том случае, когда не происходит транспорта никаких других веществ, кроме K^+ и H^+ , стехиометрии по протону и по заряду могут не совпадать (рис. 4.10).

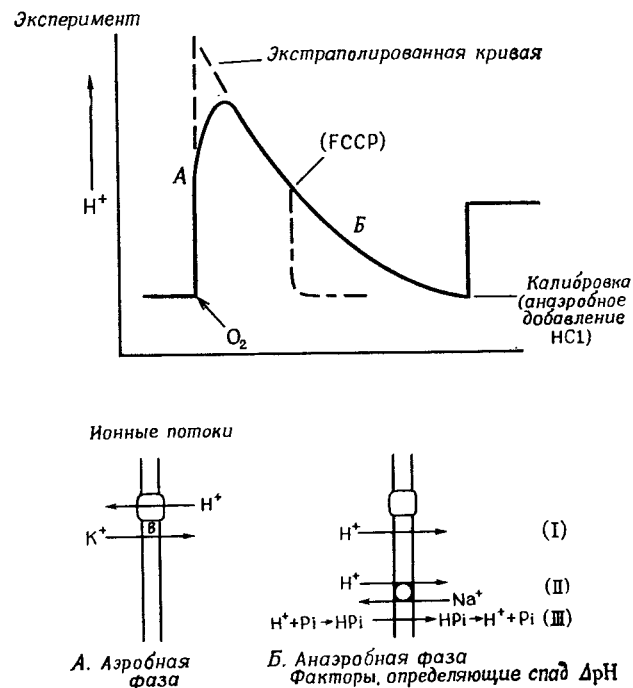


Рис. 4.9. Определение соотношения H^+/O в митохондриях методом кислородных пульсов. Использован тот же прибор, что и для определения $\Delta\mu_{H^+}$ (рис. 4.3), но без K^+ -электрода. Концентрированную суспензию митохондрий инкубируют в анаэробных условиях в среде с низкой буферной емкостью, содержащей субстрат, валиномицин и KCl в высокой концентрации. рН-Электрод должен иметь малое время ответа. Реакцию начинают быстрым добавлением небольшого количества среды, насыщенной воздухом (содержит около 5 нмоль O -мг белка $^{-1}$). Наблюдается быстрое закисление среды в результате работы дыхательной цепи, которая за 2—3 с использует добавленный O_2 . Валиномицин и K^+ необходимы для того, чтобы предотвратить образование $\Delta\psi$, который препятствует дальнейшему выбросу протонов. По исчерпании O_2 рН среды восстанавливается, так как протоны возвращаются в матрикс. Этот процесс может определяться: (I) — протонной проводимостью мембраны (добавление FCCP ускоряет процесс); (II) — эндогенным Na^+/H^+ -антипортом; (III) — электронейтральным входом P_i (разд. 7.5). Для расчета H^+/O кривую следует экстраполировать к моменту, когда O_2 еще не исчерпан. В — валиномицин.

Другой метод определения соотношений H^+/O основан на измерениях начальных скоростей дыхания и выброса протонов при добавке субстрата к лишенным субстратов митохондриям (Brand et al., 1976).

Величины стехиометрических соотношений, определенные этими методами, должны соответствовать требованиям, предъявляемым термодинамикой. Другими словами, энергия, запа-

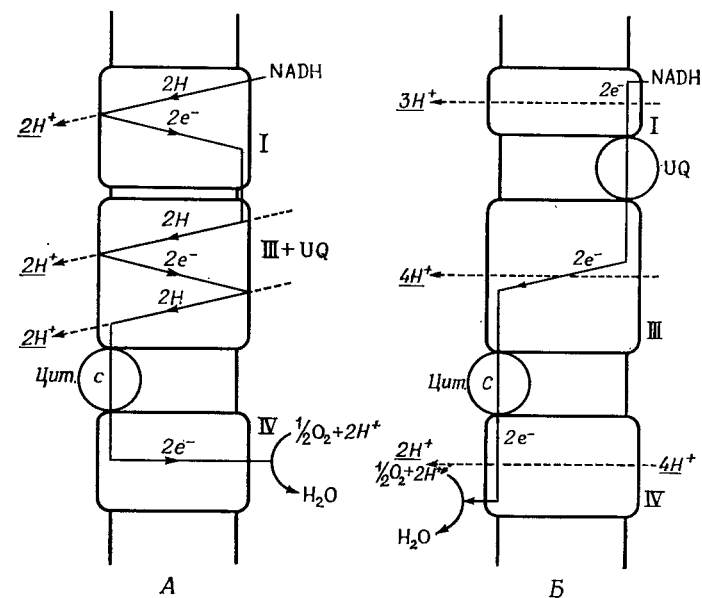


Рис. 4.10. Стехиометрия переноса протонов и зарядов в дыхательной цепи. А. Петли в дыхательной цепи. Б. Конформационные помпы.

	Модель А		Модель Б	
	$H^+/2e^-$	$q^+/2e^-$	$H^+/2e^-$	$q^+/2e^-$
Комплекс I	2	2	3	3
Комплекс III	4	2	4	2
Комплекс IV	0	2	2	4
Сукцинат — O_2	4	4	6	6
	6	6	9	9

Отметим, что соотношение $q^+/2e^-$ отражает движение зарядов через мембраны, т. е. учитывает и протоны, и электроны. Стехиометрические соотношения в конформационной модели носят, скорее всего, иллюстративный характер.

саемая в протонном градиенте, не должна превышать энергетического потенциала редокс-пары в данном протонпереносящем участке цепи. Известно, что протонпереносящие участки комплексов I и III дыхательной цепи функционируют вблизи состояния равновесия и реакции в них легко могут быть обращены. Следовательно, стехиометрия $H^+/2e^-$ для этих участков может быть приблизительно определена, исходя из чисто термодинами-

ческих величин: известных ΔE_n (разд. 3.8) и компонентов $\Delta \mu_{H^+}$.

Измерения точных значений стехиометрии $H^+/2e^-$ для различных участков цепи имеют большое значение, так как с их помощью можно сделать выбор между различными схемами переноса протонов. Прямой механизм переноса групп, предложенный Митчеллом (разд. 1.4), предсказывает точную величину $2H^+/2e^-$ для каждой «петли» (рис. 4.10). Согласно этой гипотезе, протоны освобождаются в результате переноса электронов между переносчиками H-атомов ($H^+ + e^-$) и чисто электронными акцепторами. Прямой механизм требует также существования ряда структурных особенностей организации дыхательной цепи, которые мы обсудим в разд. 5.4.

Ранние измерения величин H^+/O методом кислородных пульсов (Mitchell, Moyle, 1967a) дали для участков $NADH \rightarrow O_2$ и сукцинат $\rightarrow O_2$ значения, близкие к тем, что были предсказаны согласно прямому механизму (соответственно 6 и 4, см. рис. 4.10). Однако после того, как было обнаружено, что N-этилмалеимид, блокирующий симпорт H^+/P_i (см. выше), повышает наблюдаемые величины стехиометрии, эти результаты оказались под сомнением.

Если наблюдаемые величины $H^+/2e^-$ действительно слишком высоки для прямого механизма петель, то приходится предполагать существование конформационного сопряжения транспорта протонов и переноса электронов по цепи (разд. 5.4). Такое предположение, в отличие от гипотезы петель, может быть использовано для объяснения любой наблюдаемой стехиометрии. На рис. 4.10 представлены сравнительные характеристики двух гипотетических механизмов. Поскольку в литературе существуют очень большие расхождения в точных значениях стехиометрии $H^+/2e^-$, на рисунке представлены усредненные цифры. Следует отметить, что обе гипотезы предсказывают одинаковую стехиометрию для комплекса III, но, согласно конформационной модели, два дополнительных протона переносятся в комплексе IV (разд. 5.9) и, возможно, один дополнительный протон в комплексе I (разд. 5.6).

4.4. СТЕХИОМЕТРИЯ ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ В АТР-СИНТЕАЗЕ

(Обзоры: Mitchell, Moyle, 1968; Moyle, Mitchell, 1973; Brand, 1977)

Число протонов, переносимых при синтезе одной молекулы АТР, можно рассчитать, измеряя начальный выброс протонов при гидролизе небольшого известного количества АТР или

сравнив термодинамические величины $\Delta \mu_{H^+}$ и ΔG_p для реакции синтеза АТР в условиях равновесия. Первый подход аналогичен методу кислородных пульсов (разд. 4.3), только вместо O_2 используется АТР. При этом возникает, однако, ряд дополнительных проблем. Во-первых, при АТРазной реакции могут выделяться скалярные протоны [уравнение (3.9)]. Во-вторых, вход АТР и выход из митохондрий ADP и P_i могут сопровождаться переносом протонов (разд. 7.5). Эту вторую трудность можно преодолеть, если работать на вывернутых субмитохондриальных частицах (разд. 1.4), а первую — подерживая pH на таком уровне, когда скалярные протоны не выделяются (Thayer, Hinkle, 1973). В таких экспериментах были получены величины, близкие к $2H^+/ATP$ для митохондриальной АТР-синтетазы (рис. 4.11).

Термодинамический подход был использован как в опытах на митохондриях, так и на субмитохондриальных частицах, бактериальных везикулах и хлоропластах. В случае интактных митохондрий этот метод чаще всего, но не всегда дает величину, близкую к 3 (рис. 4.12). Можно полагать, что два протона переносятся через АТР-синтазу, а один — сопряженно с транспортом ADP, P_i и АТР (разд. 7.5).

Стехиометрия выброса протонов дыхательной цепью и обратного входа их при синтезе АТР должна согласоваться с общей наблюдаемой стехиометрией синтеза АТР (разд. 4.6), т. е.

$$ADP/2e^- = H^+/2e^- \div H^+/ATP. \quad (4.1)$$

Общепринятые максимальные величины $ADP/2e^-$, равные 3 для окисления NADH и 2 для окисления сукцината (разд. 4.6), а также величина H^+/ATP , равная 3 для синтеза и переноса АТР, дают значения H^+/O , равные 9 и 6 соответственно. Эти цифры

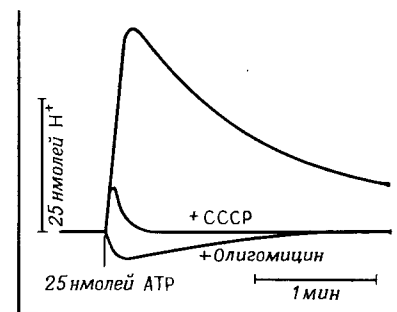


Рис. 4.11. Определение стехиометрии H^+/ATP в субмитохондриальных частицах (Thayer, Hinkle, 1973). Субмитохондриальные частицы из сердца быка инкубировали в среде с низкой буферной емкостью, содержащей KCl и валиномицин. Субстратов дыхания не добавляли. Среда содержала 2 мМ Mg^{2+} , так как АТР реагирует лишь в форме комплекса с Mg^{2+} . Исходный pH составлял 6,1, так что скалярные протоны при гидролизе АТР не выделялись. После того как pH стабилизировался, добавляли 25 нмоль $Mg-ATP$. В присутствии олигомицина закисления не наблюдалось, а в присутствии протонофора (СССР) происходило небольшое закисление, которое затем быстро исчезало.

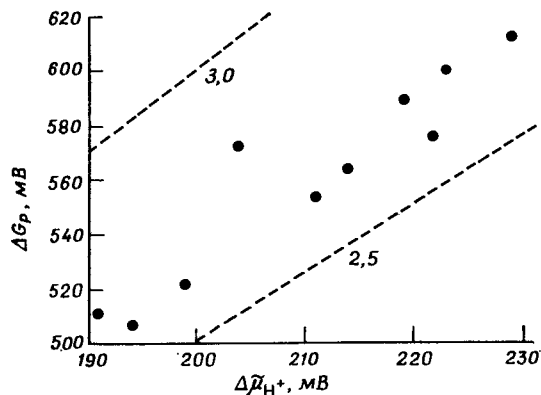


Рис. 4.12. Термодинамические соотношения между внемитохондриальным фосфатным потенциалом и $\Delta\psi_{H^+}$. Митохондрии бурого жира инкубировали в среде, содержащей в качестве субстрата α -глицерол-3-фосфат; GDP, который блокирует протонную утечку в этих митохондриях (разд. 4.5); валиномицин, ^{86}Rb , ^{14}C -метиамин и ^3H -ацетат для измерения $\Delta\psi_{H^+}$ (разд. 4.2). Среда также содержала ADP и протонатор FCCP в различных субоптимальных концентрациях (разд. 2.5). Для каждой концентрации FCCP после установления стационарного состояния определяли величину $\Delta\psi_{H^+}$. В параллельном эксперименте та же среда (но без меченых соединений, необходимых для измерения $\Delta\psi_{H^+}$) содержала ^3H -ADP и FCCP в той же концентрации. После установления стационарного состояния в среде определяли содержание ^3H -АТФ и ^3H -ADP и рассчитывали фосфатный потенциал (выраженный в милливольты). Диагональные штриховые линии показывают, какие наивысшие значения фосфатного потенциала можно получить при данном $\Delta\psi_{H^+}$, если при синтезе и транспорте 1 молекулы АТФ переносится 2,5 или 3 протона (Nicholls, Bergson, 1977).

лучше согласуются с конформационной моделью, чем с механизмом петель в дыхательной цепи, который предсказывает значения 6 и 4 соответственно (рис. 4.10).

4.5. ПРОТОННЫЙ ТОК, ПРОТОННАЯ ПРОВОДИМОСТЬ И ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

В предыдущих разделах мы рассматривали проблемы, связанные с генерацией и использованием разности потенциалов в протонном цикле. В этом разделе мы обратимся к факторам, регулирующим протонный ток в цикле.

Величина тока протонов в протонном цикле (J_{H^+}) может быть определена, исходя из скорости дыхания и стехиометрии H^+/O :

$$J_{H^+} = dO/dt \times H^+/O, \quad (4.2)$$

т. е. для данного субстрата протонный ток пропорционален скорости дыхания. Важнейшие аспекты регуляции скорости митохондриального дыхания были установлены задолго до того, как была сформулирована хемиосмотическая гипотеза. Важным успехом теории явилось объяснение эффекта различных агентов на регуляцию дыхания в рамках их действия на величину протонного тока.

Начиная с 50-х годов одним из главных инструментов при исследованиях митохондрий стал кислородный электрод (рис. 4.13). Кислородный электрод позволяет измерять лишь скорость переноса электронов на кислород, поэтому для того, чтобы изучать с его помощью какие-то митохондриальные процессы, необходимо создать такие условия, когда эти процессы определяют скорость потребления O_2 . Такими скоростямилимитирующими процессами могут быть (рис. 4.14):

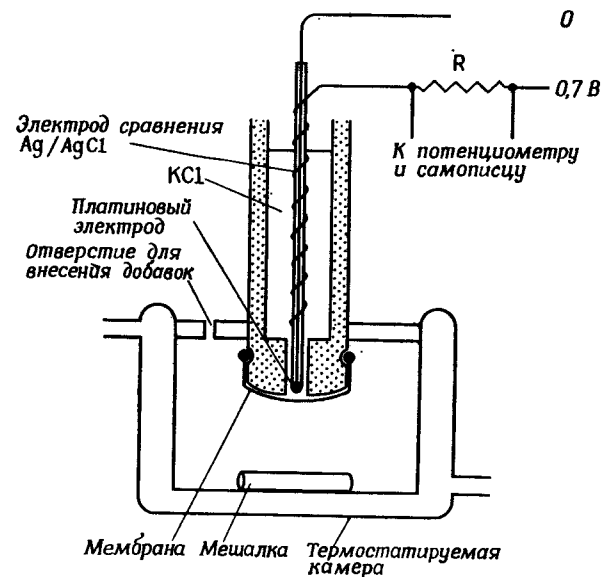


Рис. 4.13. Кислородный электрод Кларка. На платиновом электроде O_2 восстанавливается до H_2O . Если на нем поддерживается отрицательный потенциал 0,7 В относительно электрода сравнения $Ag/AgCl$, то ток, текущий в цепи, будет пропорционален скорости превращения O_2 на электроде. При определенных условиях этот ток пропорционален концентрации O_2 в растворе. Тонкая проницаемая для O_2 мембрана предохраняет электрод от отравления. Поскольку на электроде происходит превращение кислорода, среда должна непрерывно перемешиваться, чтобы на электродной мембране не образовывался слой, лишенный O_2 . Ячейка должна быть герметична; она имеет лишь небольшое отверстие для внесения добавок. Электрод калибруют с помощью среды, насыщенной воздухом, а первоначального исчерпания кислорода достигают с помощью добавок дитионита. Обычно ячейка имеет объем 2 мл, и для опыта требуется 2—3 мг белка митохондрий.

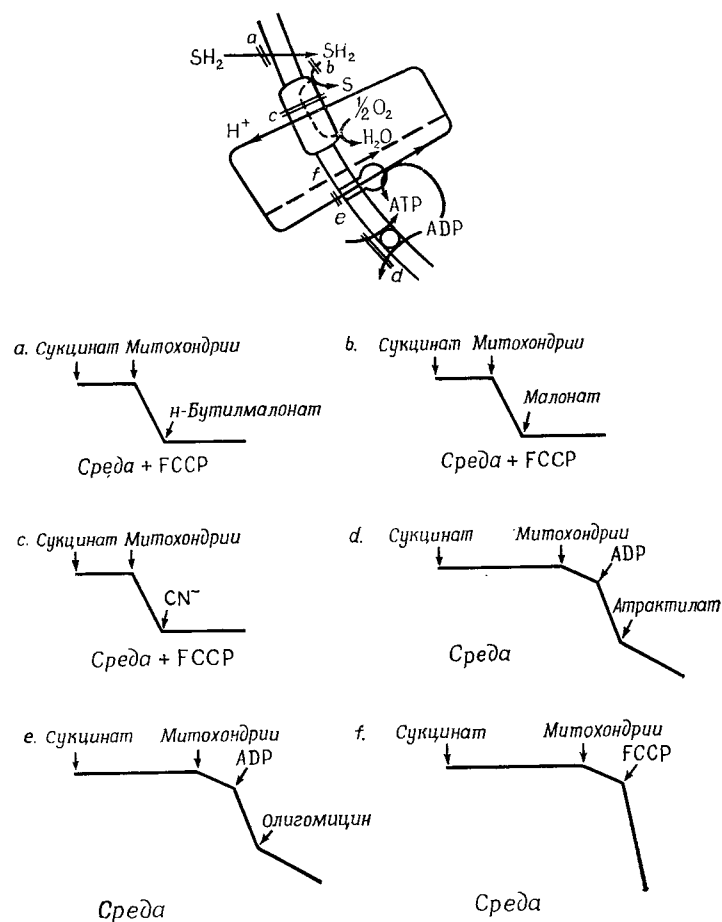


Рис. 4.14. Использование кислородного электрода для изучения процессов превращения энергии в митохондриях. На схеме показаны шесть различных способов воздействия на пути превращения энергии в митохондриях. Схематические кривые показаний кислородного электрода иллюстрируют, как с его помощью можно изучать эти воздействия. Среда инкубации должна иметь соответствующую осмолярность, буферную емкость и содержать P_i . *a* — ингибирование транспорта субстрата; *b* — ингибирование дегидрогеназы субстрата; *c* — ингибирование дыхательной цепи; *d* — ингибирование транслоказы адениновых нуклеотидов; *e* — ингибирование АТФ-синтетазы; *f* — добавка протонофора.

- а) транспорт субстратов через мембрану;
- б) активность дегидрогеназы данного субстрата;
- в) активность дыхательной цепи;
- г) транспорт адениновых нуклеотидов через мембрану;
- д) АТФ-синтетазная активность;

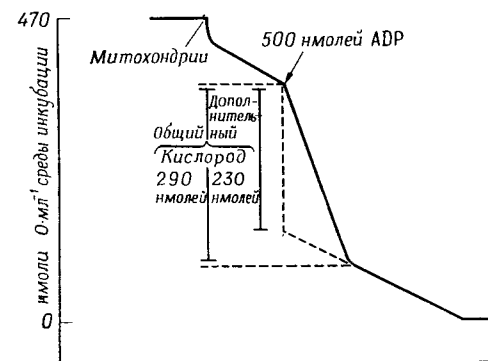


Рис. 4.15. Определение соотношения ADP/O с помощью кислородного электрода. В представленном эксперименте митохондрии из печени крысы инкубировали в присутствии сукцината в качестве субстрата (чтобы блокировать эндогенное NAD^+ -зависимое дыхание, в среду добавляли ротенон). Стрелкой указано добавление ADP. После того как практически весь ADP был профосфорилирован, установилась низкая скорость дыхания — состояние 4. Если полагать, что протонная утечка, определяющая дыхание в состоянии 4, сохраняется неизменной и в состоянии 3, то для расчета ADP необходимо учитывать лишь дополнительно поглощенный кислород. Если же предположить, что в состоянии 3 пассивной утечки не происходит и все дыхание используется для синтеза АТФ, то для расчета следует учитывать весь использованный кислород. В действительности второе предположение оказывается более точным, так как протонная утечка сильно зависит от $\Delta\mu_{H^+}$, и небольшое его снижение (рис. 4.16) приводит к значительному уменьшению утечки. В нашем примере $ADP/O = 500/290 = 1,72$.

е) протонная проводимость мембраны.

На рисунке 4.1 показаны три основных состояния протонного цикла: разомкнутый цикл, где протоны не могут вернуться в матрикс; замкнутый цикл, в котором возврат протонов сопряжен с синтезом АТФ, и замкнутый цикл, где протонная утечка не сопряжена с синтезом АТФ. Эти состояния легко могут быть созданы в ячейке O_2 -электрода (рис. 4.15). Их принято обозначать согласно терминологии, предложенной Чансом и Вильямсом (Chance, Williams, 1955) (табл. 4.1).

Внесение митохондрий в инкубационную смесь (рис. 4.15) приводит к небольшому всплеску дыхания, которое затем устанавливается на низком уровне — состоянии 4. Хотя в митохондриальном матриксе и содержатся адениновые нуклеотиды, их количество относительно невелико (около 10 нмоль на 1 мг белка), и после начала реакции этот пул быстро фосфорилируется, пока не достигается равновесие с $\Delta\mu_{H^+}$. Дыхание в состоянии 4 происходит потому, что внутренняя мембрана митохондрий не абсолютно непроницаема для протонов. Они могут медленно проходить через мембрану даже в отсутствие синтеза АТФ. Одним

из факторов, определяющих утечку протонов в состоянии 4, является циклический перенос Ca^{2+} через мембрану (разд. 8.4).

Фактором, который в действительности контролирует скорость дыхания, является степень отклонения системы от равновесия между редокс-потенциалом пары в протонпереносящем участке цепи и величиной $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ (разд. 3.9). В состоянии 4 дыхание автоматически регулируется таким образом, что выброс протонов дыхательной цепью точно уравнивает их утечку через мембрану. Если в какой-то момент скорость выхода протонов превысит скорость их входа, то возрастет $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, уменьшится отклонение от равновесия между дыхательной цепью и $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, а в результате понизится протонный ток и стационарное состояние восстановится.

На рис. 4.15 показано, как меняется дыхание в состоянии 4, если в среду добавить ADP. ADP проникает в матрикс в обмен на АТФ с помощью транслоказы адениновых нуклеотидов (разд. 7.5). В результате ΔG системы $\text{ATP/ADP} + \text{P}_i$ в матриксе понижается и нарушается равновесие АТФ-синтетазной реакции. Далее последовательно происходит следующее: а) АТФ-синтаза работает в направлении синтеза АТФ и протоны при этом переносятся в матрикс; б) вход протонов обуславливает понижение $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$; отклонение от равновесия между дыхательной цепью и $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ возрастает; г) с ростом протонного тока увеличивается скорость дыхания. Как и в состоянии 4, в новом состоянии Z_{ADP} дыхание саморегулируется так, что скорость выброса протонов уравнивает возросшую скорость их входа. Синтез АТФ и дыхание в состоянии Z_{ADP} могут остановиться в трех случаях: а) если фосфорилируется такое количество ADP, что устанавливается термодинамическое равновесие; б) если подавляется обмен адениновых нуклеотидов через мембрану при добавлении такого ингибитора, как атрактиллат (разд. 7.6); в) если подавляется АТФ-синтаза, например при добавлении олигомицина (разд. 7.3).

Энергетическое сопряжение между дыхательной цепью и разностью электрохимических потенциалов протонов чрезвычайно эффективно, поэтому даже небольшое отклонение от равновесия в системе вызывает значительные энергетические потоки. Так, из данных рис. 4.16 следует, что после добавления ADP, которое вызывает переход в состояние Z_{ADP} с высокой скоростью дыхания, $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ снижается менее чем на 30%. Истинное отклонение от равновесия в этом случае еще меньше, так как разность редокс-потенциалов также снижается (разд. 5.3).

Высокая эффективность энергетического сопряжения сохраняется в состоянии Z_{ADP} и на уровне АТФ-синтазы. Действительно, высокая скорость синтеза АТФ поддерживается при

очень небольшом отклонении от равновесия между $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ и ΔG_{P} .

Протонофоры разобщают окислительное фосфорилирование, повышая протонную проводимость через бислойные участки мембраны (разд. 2.5). Они могут быть использованы для снятия ингибирования входа протонов, возникающего при блокировании синтеза АТФ. В результате такие протонофоры, как, например, FCCP, могут индуцировать быстрое дыхание (состояние $\text{Z}_{\text{разобщ}}$) независимо от присутствия олигомицина, атрактиллата или отсутствия ADP (рис. 4.14).

Дыхательная цепь отвечает на снижение $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ при добавке протонофора так же, как и на снижение $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ за счет синтеза АТФ. В обоих случаях скорость выброса протонов (и дыхания) растет до тех пор, пока не уравнивает скорость их входа. В результате устанавливается такая $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ при которой скорости двух $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ -за-

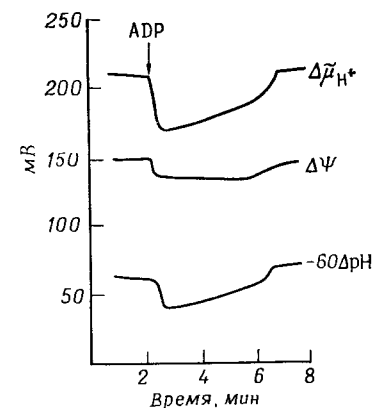


Рис. 4.16. После добавления ADP и вызванного им перехода митохондрий печени из состояния 4 в состояние 3 наблюдается лишь небольшое снижение $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ (Nicholls, 1974). Митохондрии печени крысы инкубировали в сахарозной среде, содержащей в качестве субстрата β -гидроксипутират, $^{86}\text{Rb}^+$ и валиномицин для измерения $\Delta\psi$, а также ^{14}C -метиламин и ^3H -ацетат для измерения $\Delta p\text{H}$. В момент, указанный стрелкой, добавляли такое количество ADP, которого хватало, чтобы поддерживать дыхание в состоянии 3 в течение 5 мин. $\Delta\psi$ и $\Delta p\text{H}$ измеряли с помощью фильтрации митохондрий через мембранные фильтры.

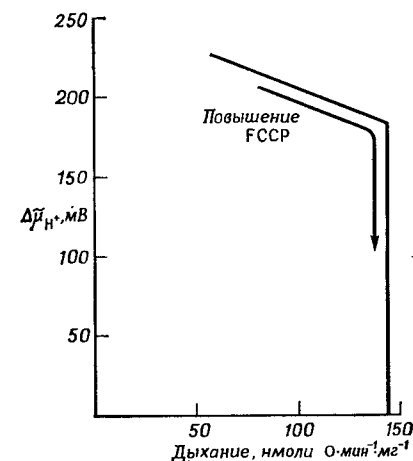


Рис. 4.17. Скорость дыхания как функция $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ (Nicholls, Bernson, 1977). Митохондрии бурого жира инкубировали в среде, содержащей глицерол-3-фосфат, олигомицин, блокирующий АТФ-синтазу, и GDP, который ингибирует природную протонную проводимость, характерную для этих митохондрий (разд. 4.5). Параллельно измеряли скорость дыхания и $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ при возрастающих концентрациях протонофора.

висимых процессов — входа протонов и дыхания — совпадают. Скорость дыхания не возрастает бесконечно при повышении концентрации протонофора, так как достигается состояние, когда скорость определяется кинетическими особенностями дыхательной цепи. Дыхание при этом становится неконтролируемым, т. е. оно не зависит более от степени отклонения от термодинамического равновесия. Это состояние обычно наступает еще при очень высоких значениях $\Delta\mu_{H^+}$ (рис. 4.17). В связи с этим важно различать условия, когда отсутствует дыхательный контроль ($\Delta\mu_{H^+}$ от 0 до 170 мВ; рис. 4.17), и условия, когда митохондрии полностью дезэнергизованы ($\Delta\mu_{H^+} = 0$).

В электрической цепи проводимость каждого компонента определяется как величина тока через него при разности потенциалов, равной единице. Аналогичный смысл имеет и эффективная протонная проводимость мембраны (C_{MH^+}) в протонном цикле;

$$C_{MH^+} = J_{H^+} / \Delta\mu_{H^+}. \quad (4.3)$$

В табл. 4.3 приведены расчеты величины C_{MH^+} и некоторых параметров, введенных еще до появления хемиосмотической гипотезы, для типичного препарата митохондрий печени (разд. 4.6).

Величина эндогенной протонной проводимости мембраны во многом определяет биоэнергетическое «поведение» данного препарата митохондрий. Как будет показано далее в разд. 4.6, все

Таблица 4.3

Расчет параметров превращения энергии в митохондриях

Известно, что обычные препараты митохондрий из печени, окисляющие сукцинат в состоянии 4 (табл. 4.1), имеют скорость дыхания 15 нмоль/О $\times$ $\times$ мин $^{-1}$ ·мг белка $^{-1}$ и поддерживают $\Delta\mu_{H^+}$ 220 мВ. При добавлении протонофора FCCP в небольшой концентрации, скорость дыхания повышается до 100 нмоль О $\times$ мин $^{-1}$ ·мг белка $^{-1}$ и $\Delta\mu_{H^+}$ понижается до 40 мВ. Если принять, что соотношение H^+/O для сукцината равно 6, то можно рассчитать величину дыхательного контроля, протонный ток и эффективную протонную проводимость до и после добавления FCCP.

$$a) \text{ Величина дыхательного контроля} = \frac{\text{Дыхание после добавления FCCP}}{\text{Дыхание до добавления FCCP}} = 100/15 = 6,7$$

$$b) \text{ Протонный ток} = \text{Дыхание} \cdot H^+/O = 90 \text{ (—FCCP)} = 600 \text{ (+FCCP)}$$

(единицы: нмоль H^+ · мин $^{-1}$ · мг белка $^{-1}$)

$$\text{Протонная проводимость } C_{MH^+} = \frac{\text{Протонный ток}}{\Delta\mu_{H^+}} = 90/220 =$$

$$= 0,41 \text{ (—FCCP)} = 600/40 = 15 \text{ (+FCCP)}$$

$$\text{(единицы: нмоль } H^+ \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot \text{мВ}^{-1})$$

общие нехемиосмотические параметры энергизации могут быть сведены к величине C_{MH^+} . Действительно, эффективность энергетического сопряжения будет тем выше, чем ниже C_{MH^+} . Существует, однако, один тип митохондрий, для которых повышение протонной проводимости внутренней мембраны имеет физиологический смысл. Это митохондрии из ткани бурого жира, имеющие очень высокую скорость дыхания, которая необходима как для термогенеза, так и для уничтожения избытка субстратов в случае регуляции количества жировых запасов. В этой ткани нормальный контроль дыхания уровнем синтеза АТР нарушен, так как во внутренней мембране находится белок, работающий как регулируемый протонный переносчик. Он обеспечивает вход протонов в митохондрии и переход дыхания в состояние 3 без стехиометрического синтеза АТР (Nicholls, 1976, 1979) и в 30 раз по сравнению с митохондриями других типов повышает величину C_{MH^+} .

4.6. НЕХЕМИОСМОТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ

4.6.1. ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Дыхательный контроль — это параметр, введенный еще до появления хемиосмотической теории, который позволяет оценить интактность митохондриального препарата. Он определяется как отношение скорости дыхания при максимальном синтезе АТР (т. е. в присутствии ADP) или в присутствии протонофора к скорости дыхания в отсутствие синтеза АТР или протонофора, т. е.

$$\text{Дыхательный контроль} = \frac{\text{Дыхание в состоянии 3}}{\text{Дыхание в состоянии 4}}. \quad (4.4)$$

Обычно его величина варьирует от 3 до 15 в разных препаратах. Хотя этот параметр можно использовать на практике, необходимо помнить, что он является смешанной функцией: уровень дыхания в состоянии 4 определяется протонной проводимостью (C_{MH^+}) мембраны, а скорость дыхания в состоянии 3 лимитируется различными процессами: транспортом субстратов, активностью дегидрогеназ, дыхательной цепью, синтезом АТР или переносом адениновых нуклеотидов. Поэтому к интерпретации величин дыхательного контроля следует подходить с осторожностью. Собственно уровень дыхания в состоянии 4 может служить иногда лучшим критерием степени сопряженности дыхания и синтеза АТР, чем дыхательный контроль.

4.6.2. СООТНОШЕНИЯ ADP/O И P/O

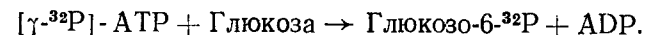
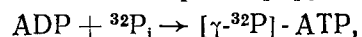
Стехиометрические соотношения переноса протонов в дыхательной цепи и при синтезе АТФ — это вполне определенные величины, даже если их истинные значения остаются предметом дискуссий. В то же время общая стехиометрия синтеза АТФ по отношению к уровню дыхания может варьировать от теоретического максимума (около одной молекулы АТФ на $2e^-$, перенесенных через пункт сопряжения) до нуля в зависимости от величины протонной утечки, идущей в обход АТФ-синтетазы (рис. 4.1). Всякое воздействие, повышающее проводимость мембраны, будет понижать долю протонов, переносимых с помощью АТФ-синтетазы. При повышении $\Delta\mu_{H^+}$ снижается величина $\Delta\mu_{H^+}$ (рис. 4.17), так что термодинамическая способность к синтезу АТФ также уменьшается. Поскольку определить ток утечки в условиях синтеза АТФ очень трудно, при расчетах величин ADP/O и P/O путем экстраполяции к нулевой протонной утечке возможны большие ошибки.

4.6.2.1. Определение ADP/O с помощью кислородного электрода

Этим методом определяют начальную величину ускорения дыхания в состоянии 3 после добавления определенного небольшого количества ADP к митохондриям, дышащим в состоянии 4 (рис. 4.15). Практически весь добавленный ADP фосфорилируется при этом до АТФ, так что соотношение АТФ : ADP обычно достигает 100 : 1 после восстановления состояния 4, и можно рассчитать отношение числа молей добавленного ADP к числу молей использованного кислорода. Для того чтобы скорректировать данные с учетом утечки протонов, принято считать, что она прекращается при переходе в состояние 3. На первый взгляд может показаться, что если после включения фосфорилирования $\Delta\mu_{H^+}$ снижается лишь на 30% (рис. 4.16), то и величина утечки не должна заметно меняться. В действительности, однако, протонная проводимость мембраны падает практически до нуля, если $\Delta\mu_{H^+}$ опускается ниже 200 мВ, так что при расчетах стехиометрических соотношений правильнее полностью учитывать поглощенный при фосфорилировании кислород.

4.6.2.2. Определение P/O с помощью гексокиназной ловушки АТФ

Следующий метод состоит в измерении синтеза $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ из ADP и $^{32}\text{P}_i$ в присутствии гексокиназы, в результате действия которой фиксируется метка и регенерируется ADP:



В этом методе дыхание измеряют кислородным электродом, затем реакцию останавливают и определяют глюкозо-6- ^{32}P после его отделения от $^{32}\text{P}_i$. Снижения скорости дыхания после стимуляции не наблюдается, так как ADP в этих условиях не исчерпывается. В отличие от того, что мы имеем при измерении с помощью кислородного электрода, в этих условиях гексокиназа поддерживает ΔG_p на постоянном очень низком уровне. Это позволяет измерять синтез АТФ даже при относительно неблагоприятных условиях.

Значения ADP/ $2e^-$, как и в случае со многими другими стехиометрическими соотношениями, остаются источником дискуссий. «Классическая» величина 1 АТФ/ $2e^-$ на протонпереносящий комплекс согласуется со стехиометрией H^+/O 6 и 4 для участков цепи NADH— O_2 и сукцинат — O_2 соответственно лишь в том случае, если для синтеза АТФ и переноса через мембрану адениновых нуклеотидов и P_i достаточно двух протонов. Существуют, однако, строгие доказательства того, что для транспорта субстратов фосфорилирования требуется перенос третьего протона (разд. 7.6). Более высокие величины H^+/O , равные 9 и 6 (рис. 4.10), для NADH и сукцината согласуются с соотношением $\text{H}^+/\text{ATP}=3$, включая транспорт. Бранд и др. (Brand et al., 1978) получили дробные значения величин ADP/ $2e^-$ для участков от сукцината до цитохрома c и от цитохрома c до O_2 , равные 0,67 и 1,33 соответственно.

4.7. ОБРАТНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ И ПРОТОННЫЙ ЦИКЛ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ АТФ

АТФ-синтетаза способна работать обратимо, и постоянный синтез АТФ поддерживается лишь благодаря постоянному поддержанию уровня $\Delta\mu_{H^+}$ и использованию АТФ клеткой. Если дыхательная цепь ингибирована и к митохондриям добавлен АТФ, то АТФ-синтетаза работает как АТРаза и генерирует $\Delta\mu_{H^+}$ примерно той же величины, что и работающая дыхательная цепь (рис. 4.7). Протонный цикл при этом может быть замкнут, если существует вход протонов в матрикс. Действительно, протонофоры повышают скорость гидролиза АТФ так же, как и скорость дыхания; возникает так называемая «стимулированная разобщителем АТРазная активность». Классический подход, позволяющий различить, чем поддерживается энергозависимый процесс в митохондриях: непосредственно $\Delta\mu_{H^+}$ или посредством АТФ, состоит в определении чувствительности процесса к ингибитору АТФ-синтетазы олигомицину (разд. 1.4). Зависимый от $\Delta\mu_{H^+}$ процесс должен быть нечувствителен к олигомицину, если потен-

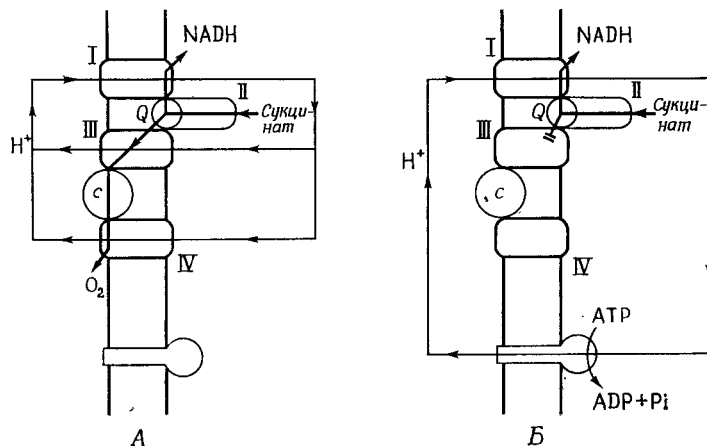
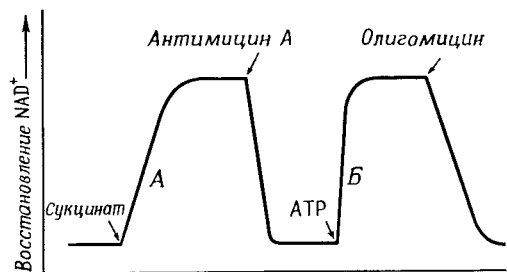


Рис. 4.18. Обратный перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий. Схематически показаны ответы полученные обработкой ультразвуком субмитохондриальных частиц в присутствии NAD^+ . А. Восстановление NAD^+ (измеряемое при 340 нМ) вызвано обратным переносом электронов в комплексе I. Сукцинат действует одновременно и как донор электронов для обратного переноса, и как субстрат для комплексов III и IV. Б. Сукцинат служит лишь донором электронов для восстановления NAD^+ , а $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ генерируется при гидролизе АТФ. Комплекс III блокирован антимицицином А.

циал создается дыхательной цепью, но он должен блокироваться им, если $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ генерируется за счет гидролиза АТФ. В случае АТФ-зависимого процесса должна наблюдаться обратная ситуация (рис. 4.18).

В состоянии 4 величины $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ и разности редокс-потенциалов в комплексах I и III (рис. 4.2) близки к равновесию. Таким образом можно создать условия, когда в этих участках цепи будут происходить обратные реакции за счет обратного тока протонов. Необходимо отметить, что эти соображения неприменимы к ком-

плексу IV, который работает практически необратимо. Обратный перенос электронов можно вызвать, либо генерируя $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ при гидролизе АТФ, либо используя перенос электронов от сукцината или цитохрома *c* на O_2 . В последнем случае можно наблюдать либо перенос электронов в комплексе I, либо в комплексах I и III соответственно (рис. 4.18).

В физиологических условиях митохондриальная АТФ-синтаза не работает как протонпереносящая АТРаза, возможно, за исключением периодов аноксии, когда необходимо использовать гликолитический АТФ для поддержания $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Однако некоторые бактерии, такие, как *Streptococcus faecalis*, при росте на глюкозе не имеют работающей дыхательной цепи и нуждаются в гидролизе гликолитического АТФ для поддержания $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ на мембране, необходимого для транспорта метаболитов (Harold, 1977).

4.8. СИНТЕЗ АТФ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ГРАДИЕНТА ПРОТОНОВ

(Обзоры: Jagendorf, 1975; Mitchell, 1976 b; Kagawa, 1978; Fillingame, 1980)

Хемиосмотическая гипотеза предсказывает, что искусственно созданный $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ способен обеспечить синтез АТФ в любой сопрягающей мембране, содержащей активную АТФ-синтазу. Впервые этот процесс был продемонстрирован на хлоропластах,

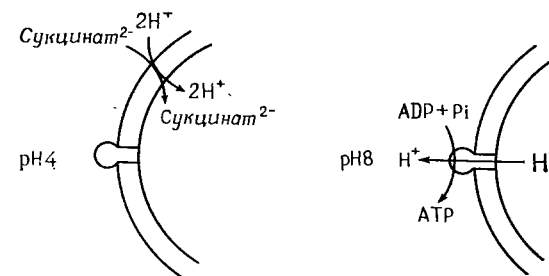
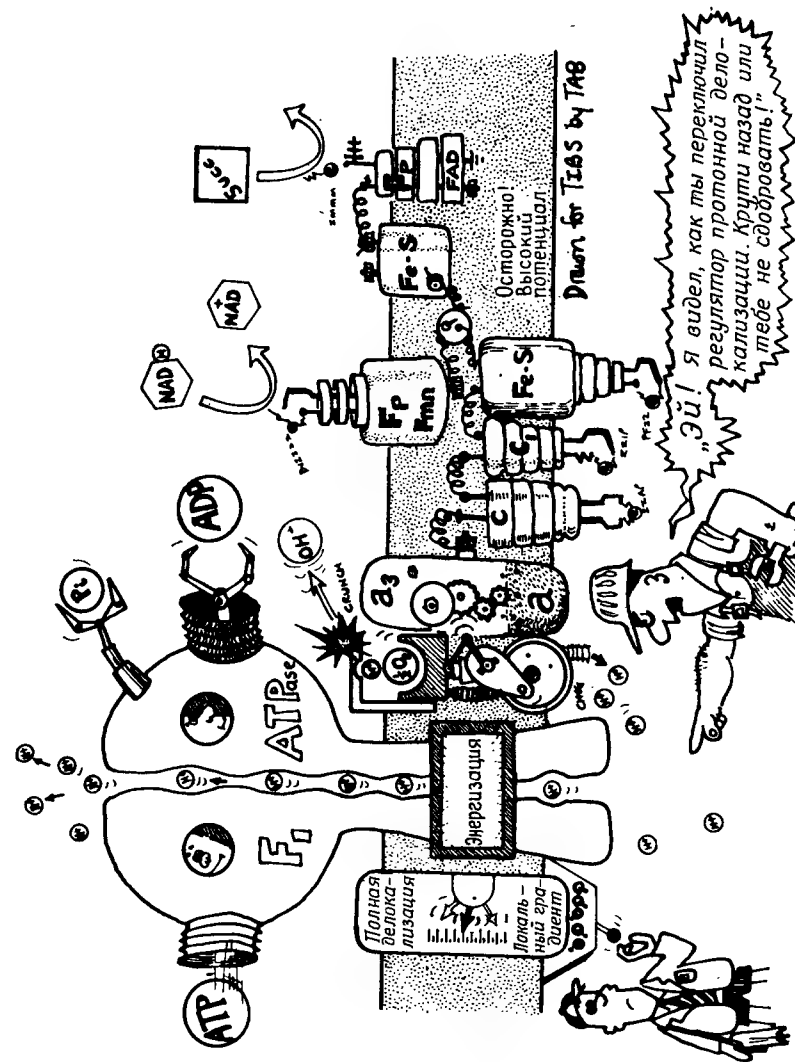


Рис. 4.19. Эксперимент с «кислотной ванной», который доказал, что АТФ может синтезироваться за счет ΔpH (Jagendorf, Uribe, 1966). Хлоропласты с разрушенной оболочкой (разд. 1.3) инкубировали в темноте при pH 4 в среде, содержащей сукцинат. Были добавлены ингибиторы, блокирующие перенос электронов. Сукцинат медленно проникал внутрь тилакоидов и освобождал там протоны, так что pH внутри тилакоидов опускался примерно до 4 (слева). Затем внешний pH быстро поднимали до 8, создавая на мембране ΔpH около четырех единиц, и одновременно добавляли ADP, P_i и Mg^{2+} (справа). Выход протонов через АТФ-синтазу приводил к синтезу до 100 молей АТФ на моль синтетазы. Искусственные протониферы, такие, как FCCP, ингибировали образование АТФ.

когда Ягендорф и Юрайб (Jagendorf, Uribe, 1966) показали, что хлоропласты, предынкубированные в темноте при кислом pH, способны синтезировать АТР в ответ на быстрое повышение pH с 4 до 8, при котором создается на мембране временный градиент pH в 4 единицы (рис. 4.19).

Хлоропласты обычно функционируют при высоком значении ΔpH и низком $\Delta\psi$ на мембране. В случае митохондрий наблюдается обратная картина, и первые успешные опыты по синтезу АТР на искусственном $\Delta\mu_{H^+}$ были поставлены в условиях, когда на мембране субмитохондриальных частиц создавали и ΔpH , и диффузионный потенциал K^+ (Thayer, Hinkle, 1975).

Эксперименты с интактными органеллами показали, что $\Delta\mu_{H^+}$ может служить единственным источником энергии для синтеза АТР. Они, однако, не позволяют отличить модели энергетического сопряжения, в которых $\Delta\mu_{H^+}$ является единственным фактором, обеспечивающим связь между дыханием и синтезом АТР, от моделей, в которых протонные помпы являются побочными системами, находящимися в равновесии с альтернативным высокоэнергетическим интермедиатом (рис. 1.11). Для этого необходимо было очистить АТР-синтазу от всех компонентов, общих с дыхательной цепью, встроить ее в искусственную мембрану (разд. 1.3) и создать на ней искусственный $\Delta\mu_{H^+}$. Все это было сделано с высокоочищенной АТР-синтазой из термофильной бактерии (Sone et al., 1977).



Митохондриальная дыхательная цепь и АТР-синтаза: дискуссия о локальном протонном цикле и делокализованном хемиосмотическом сопряжении.

ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ЦЕПИ

5.1. ВВЕДЕНИЕ

Дыхательная цепь митохондрий состоит из более чем 20 различных переносчиков электронов и множества (неопределенное количество) «структурных» белков (рис. 5.1). Общеизвестно, что дыхательная цепь функционирует как окислительно-восстановительная протонная помпа. В то же время структурная основа механизма ее работы выяснена лишь частично. В этой главе мы рассмотрим подходы, которые применяются при исследовании структуры дыхательных цепей митохондрий и бактерий.

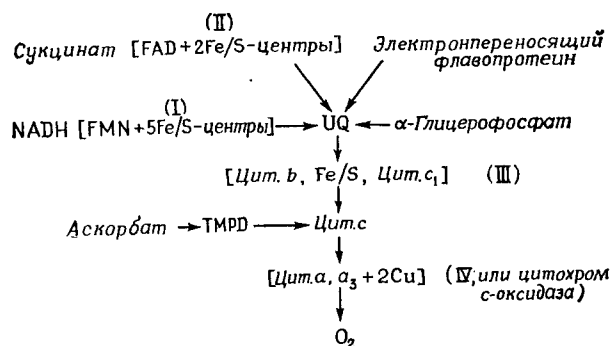


Рис. 5.1. Линейная последовательность редокс-переносчиков в дыхательной цепи митохондрий. Группы редокс-переносчиков, заключенные в скобки, образуют структурные комплексы от I до IV.

5.2. КОМПОНЕНТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ И МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

(Обзор: Slater, 1974)

Суммарная разность редокс-потенциалов при переносе электрона по всей цепи составляет 1,1 В — это разность между редокс-парами NAD^+/NADH и $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$. Большая часть дыхательной цепи обратима (разд. 4.7), и для того, чтобы происходил прямой или обратный перенос электронов, необходимо, чтобы как окисленные, так и восстановленные формы компонентов присутствовали в сопоставимых концентрациях. Другими словами, действующий редокс-потенциал пары E_h (разд. 3.3) не должен сильно отклоняться от ее потенциала полувосстановления E_m . Как будет показано на рис. 5.11, это требование выполняется на всех участках цепи, что может быть использовано для определения порядка расположения переносчиков.

На начальной стадии — переносе электронов от растворимых дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот к цепи — необходимо присутствие кофактора, который имел бы потенциал полувосстановления в районе — 300 мВ и мог работать как подвижный переносчик электронов между дегидрогеназами матрикса и мембранными компонентами цепи. Эти функции выполняет пара NADH/NAD^+ , которая имеет $E_{m,7} = -320$ мВ (рис. 5.2).

Хотя большая часть электронов попадает в дыхательную цепь этим путем, существует также группа дегидрогеназ, которые работают при потенциалах полувосстановления субстратных пар, близких к 0 мВ. Эти ферменты — сукцинатдегидрогеназа, α-глицерофосфат — дегидрогеназа и «электронпереносающий флавопротеин» (переносающий электроны от жирных кислот при β-окислении) — поставляют электроны прямо в цепь при потенциале около 0 мВ без посредства пары NAD^+/NADH (рис. 5.1). Такой прямой перенос требует, чтобы эти ферменты находились в непосредственном контакте с дыхательной цепью или, другими словами, были бы связанными с мембраной.

В дыхательную цепь входят следующие редокс-переносчики: флавопротеины, содержащие прочносвязанный FAD или FMN в качестве простетической группы (рис. 5.3) и осуществляющие перенос ($2\text{H}^+ + 2e^-$); цитохромы, имеющие порфириновые про-

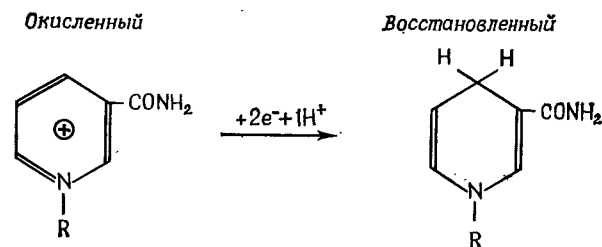


Рис. 5.2. Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+ ; никотинамид — рибоза — Р — О — Р — рибоза — аденин).

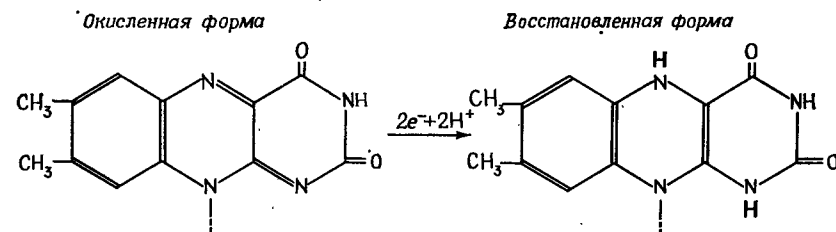


Рис. 5.3. 7,8-Диметилизоаллоксазин, входящий в состав флавинмонокнуклеотида (FMN; 7,8-диметилизоаллоксазин-D-рибитол-Р) и флавинодениндинуклеотида (FAD; 7,8-диметилизоаллоксазин-D-рибитол-Р — О — Р — рибоза — аденин).

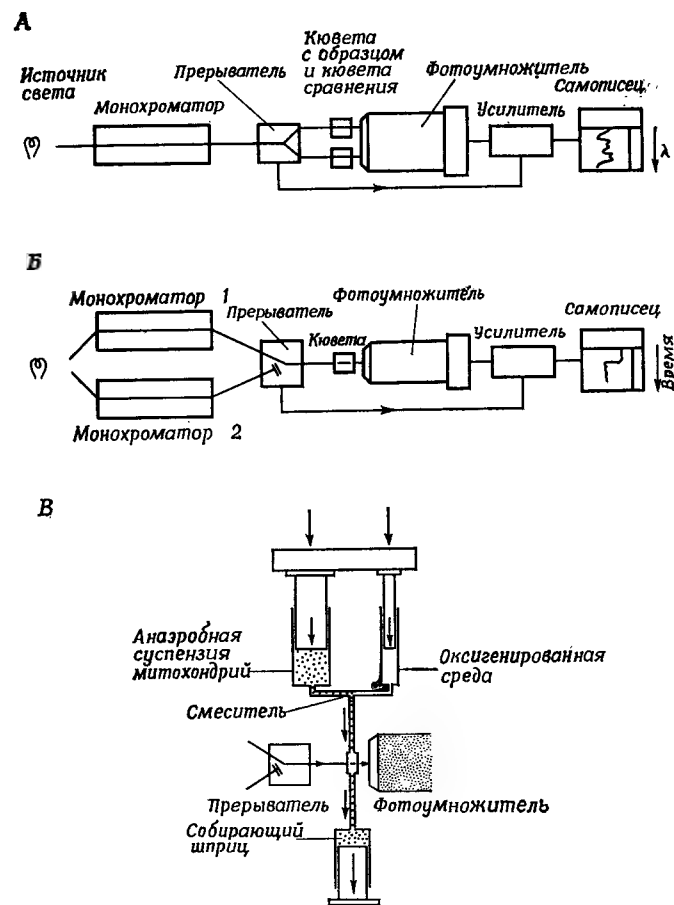


Рис. 5.4. Спектрофотометрическая техника для исследований дыхательной цепи. А. Двухлучевой спектрофотометр, в котором луч света от единственного монохроматора направляется попеременно (с помощью прерывателя, осциллирующего с частотой около 300 Гц) на кювету с образцом и кювету сравнения. Используется один большой фотоумножитель. Переменный сигнал усиливается и преобразуется таким образом, что на выходе усилителя он пропорционален разности в поглощении между двумя кюветами. Если постепенно изменять длину волны монохроматора, то можно получить дифференциальный спектр: (образец) — (контроль). Этот спектрофотометр используется для записи дифференциальных спектров, которые не меняются во времени. Б. Двухволновой спектрофотометр, где используются два монохроматора: один устанавливается на длину волны, которая оптимальна для наблюдаемых изменений, а второй — вблизи изобестической точки, где изменений не происходит. Свет от двух монохроматоров проходит попеременно через одну и ту же кювету. Усилитель преобразует затем сигнал с фотоумножителя таким образом, что на самописце записывается разность экстинкций при двух длинах волн ($\lambda_1 - \lambda_2$) в зависимости от времени реакции. Двухволновой режим работы используется для изучения кинетики изменений в спектре дан-

стетические группы и работающие как одноэлектронные переносчики; железосерные (или негемовые железосодержащие) белки, содержащие простетические группы и также способные к одноэлектронному переносу; убинон, который является подвижным жирорастворимым кофактором, переносящим ($2H^+ + 2e^-$); наконец, связанная с белком медь, которая может восстанавливаться из $Cu(II)$ в $Cu(I)$.

Цитохромы классифицируют по структуре их порфириновых простетических групп. В митохондриях содержатся цитохромы типов *a*, *b* и *c*. В некоторых бактериях в качестве терминальных оксидаз присутствуют цитохромы *d* и *o*. Цитохромы *o* — это аутооксидабельные цитохромы типа *b*, а цитохромы *d* содержат вместо порфирина частично насыщенное хлориновое кольцо.

Цитохромы были обнаружены первыми среди компонентов дыхательной цепи благодаря их различным спектрам поглощения в видимой области. Индивидуальные цитохромы имеют одну полосу поглощения в окисленной форме и, как правило, три полосы поглощения в восстановленной форме. Однако измерение абсолютных спектров при исследовании цитохромов в intactных митохондриях сопряжено с большими трудностями, которые обусловлены неспецифическим поглощением и светорассеянием органелл. К тому же эти параметры могут меняться при изменении объема матрикса за счет метаболических процессов (разд. 2.7). В связи с этим спектры цитохромов обычно определяют с помощью чувствительной дифференциальной, или двухлучевой, спектроскопии, когда луч света с постепенно возрастающей длиной волны делится между двумя кюветами, где находятся митохондрии. Условия в кюветах должны быть идентичными, за исключением того, что в одну из них добавляют компонент, изменяющий степень восстановленности исследуемых цитохромов (рис. 5.4). Сигнал от кюветы сравнения затем автоматически вычитается из сигнала от кюветы с образцом, что позволяет исключить эффекты неспецифического поглощения. На рис. 5.5 показаны спектры восстановленного и окисленного выделенного цитохрома *c*, их дифференциальный спектр (восстановленный минус окисленный), а также аналогичный дифферен-

ного компонента. В. Во многих случаях ручное перемешивание оказывается слишком медленным по сравнению с изучаемыми кинетическими изменениями. Для быстрых измерений двухволновой спектрофотометр может быть модифицирован. Суспензию митохондрий и реакционную среду помещают в два шприца и затем быстро вводят через специальный смеситель в кювету. Весь процесс занимает несколько миллисекунд. Если реагенты поступают в систему непрерывно с постоянной скоростью, то «возраст» смеси до измерения остается постоянным и зависит от длины трубок, соединяющих смеситель с кюветой (метод «непрерывной струи»). В методе «остановленной струи» после смешивания реагентов ведут наблюдения за «старением» смеси.

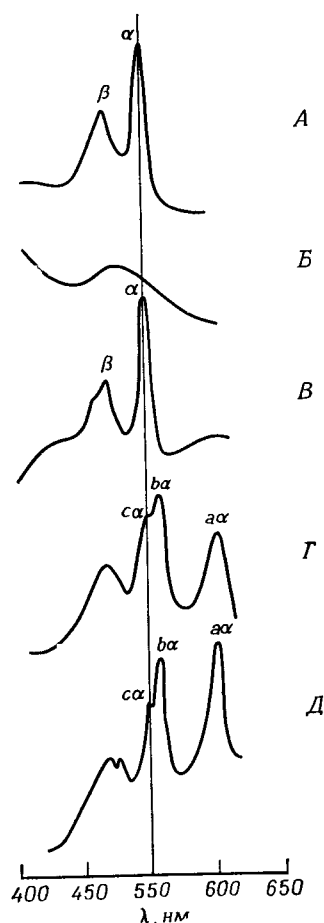


Рис. 5.5. Спектры поглощения цитохромов в видимой области. Абсолютные спектры восстановленной (А) и окисленной (Б) форм цитохрома *c* (А) и (Б) получены на очищенном препарате с помощью двухлучевого спектрофотометра, в котором кювета сравнения содержала воду. В. Дифференциальный спектр цитохрома *c* (восстановленная минус окисленная формы очищенного цитохрома *c*). Кювета измерения содержала восстановленный цитохром *c*, а кювета сравнения — окисленный цитохром *c*. Г. Дифференциальный спектр субмитохондриальных частиц из сердца быка, снятый при комнатной температуре (разность спектров СМЧ в восстановленном и окисленном состоянии). В кювету с образцом СМЧ был добавлен дитионит, а в кювету сравнения — феррицианид. Д. Тот же спектр, что и в Г, но записанный при температуре жидкого азота (77 К). Обратите внимание, что α -полосы стали более узкими. (С любезного разрешения Ingledew.)

циальный спектр субмитохондриальных частиц, где пики всех цитохромов накладываются друг на друга.

Разные цитохромы легче всего различить по α -полосе поглощения в районе 550–610 нм. Ширина спектральных полос может быть значительно уменьшена, если спектры снимать при температуре жидкого азота (77 К). В этих условиях уменьшается уширение полос за счет теплового движения молекул, а световой путь увеличивается благодаря многократному внутреннему отражению на кристаллах льда (рис. 5.5).

Дифференциальная спектроскопия при комнатной температуре позволяет различить лишь один вид цитохромов *a*, *b* и *c*. Однако в действительности каждый из них состоит из двух спектрально-различных компонентов. Цитохромы типа *a* можно разделить

на *a* и *a₃* в присутствии СО, который специфически взаимодействует с *a₃*. Неясно, однако, являются ли цитохромы *a* и *a₃* химически различными веществами. Цитохромы типа *b* состоят из двух компонентов, которые по-разному отвечают на образование $\Delta\mu_{H^+}$ на мембране (разд. 5.8). Эти цитохромы обозначают *b_T* (или *b₅₆₂*) и *b_K* (или *b₅₆₆*). В последнее время получены доказательства (разд. 5.8) того, что эти цитохромы химически идентичны, но работают в дыхательной цепи в виде димера.

Два цитохрома типа *c* (цитохромы *c* и *c₁*) можно спектрально различить при низких температурах. Цитохром *c₁* — это интегральный белок комплекса III (разд. 5.8), а цитохром *c* — периферический белок, расположенный на Ц-стороне мембраны и связывающий комплекс III с цитохром *c*-оксидазой.

В отличие от цитохромов другой большой класс электронных переносчиков — железосерные (Fe/S) белки (рис. 5.6) имеют слабо выраженные спектры в видимой области, но зато им присущи характерные спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР; Beinert, 1978; рис. 5.7). Сигнал ЭПР дает неспаренный электрон, который может присутствовать как в восстановленной, так и в окисленной формах различных Fe/S-белков. Каждую Fe/S-группу, которую можно обнаружить по ЭПР-сигналу, называют центром или кластером. Один полипептид может содержать несколько таких центров. Пока неясно, сколько Fe/S-центров содержится в дыхательной цепи; в один лишь комплекс I может входить до 7 центров (разд. 5.6).

Атомы железа в Fe/S-белках ковалентно связаны с апобелком через серу цистеиновых остатков и с другими атомами железа через кислоталабильные серные мостики (рис. 5.6). Fe/S-Центры могут содержать 2 или 4 атома железа, но каждый центр является одноэлектронным переносчиком. Fe/S-Белки широко распространены в различных электротранспортных цепях и могут иметь самые различные значения $E_{m,7}$ — от –430 мВ для ферредоксина в хлоропластах (разд. 6.4) до +360 мВ для бактериального HiPIP («высокопотенциального железосерного белка») (разд. 6.3).

Убихинон (коэнзим Q, CoQ, UQ или просто Q) в митохонд-

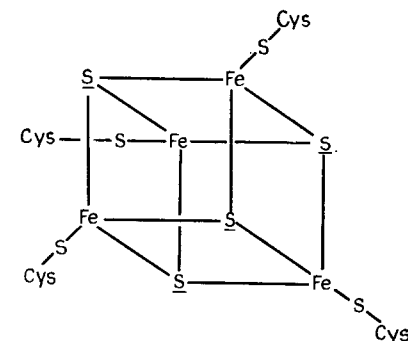


Рис. 5.6. Железосерные центры. Показан центр, содержащий 4 атома железа и 4 атома кислоталабильной серы. При обработке кислотой эти атомы серы (подчеркнуты) освобождаются в виде H_2S . Хотя центр содержит 4 атома Fe, он может претерпевать лишь одноэлектронный редокс-переход.

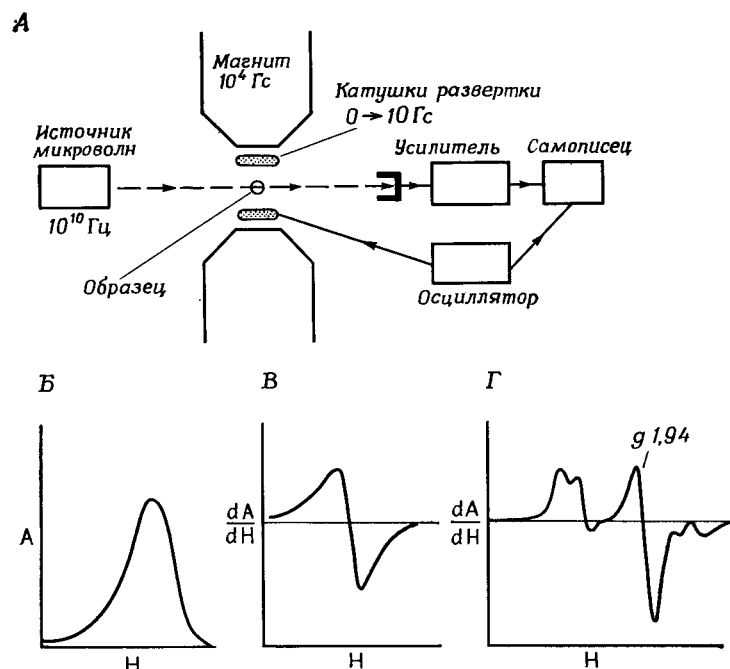


Рис. 5.7. Электронный парамагнитный резонанс и определение Fe/S-центров. А. Схема прибора. Микроволновой генератор создает монохроматическое излучение с частотой $\sim 10^9$ Гц ($\lambda = 30$ см). Неспаренные электроны в образце поглощают это излучение, если приложено внешнее магнитное поле. Точная величина поля, необходимого для поглощения, зависит от молекулярного окружения электрона и определяется формулой

$$h\nu = g\beta H,$$

где h — постоянная Планка, ν — частота излучения, β — константа (магнетон Бора), H — напряженность приложенного магнитного поля, а g — спектроскопическая константа, которая зависит от природы образца. Спектры получают, варьируя магнитное поле при постоянной частоте микроволнового излучения (В). На практике используют дифференциальные спектры (В), которые получают благодаря наложению на постоянно возрастающее поле очень быстрых модуляций небольшой амплитуды, получаемых за счет auxiliary катушек развертки. Изменение поглощения микроволн при каждом таком колебании позволяет получить первую производную спектра. Спектры сопрягающих мембран очень сложны (Г), и g -факторы различных компонентов можно определять по положению пиков, минимумов или точек перегиба. В образцах должна быть высокая концентрация белка (10–50 мг белка·мл⁻¹), и они должны находиться в замороженном состоянии.

рия животных представлен в форме UQ_{10} , т. е. его молекула содержит цепь из 10 пятиуглеродных изопреновых мономеров (рис. 5.8). Эта содержащая 50 атомов углерода цепь определяет высокую гидрофобность UQ_{10} . Присоединяя $2H^+$ и $2e^-$, UQ вос-

становляется и превращается в UQH_2 (убихинол). С помощью метода ЭПР было установлено также существование частично восстановленной свободнорадикальной формы — UQH (убисемикинон). Роль UQ в работе дыхательной цепи долгое время оставалась неясной. Удельная скорость превращения UQ значительно ниже, чем для других компонентов цепи. Это послужило основой для предположения о том, что хиноны лежат вне основного пути переноса электронов. Однако оказалось, что UQ присутствует в мембране в значительно больших количествах, чем остальные компоненты цепи, и суммарная скорость работы пула UQ вполне достаточна, чтобы обеспечить перенос электронов по основному пути (Kröger, Klingenberg, 1973). Простейшее предположение о роли UQ состоит в том, что он работает как подвижный редокс-переносчик, соединяя комплексы I и II с комплексом III. В гипотезе «Q-цикла» предполагается также, что UQ играет центральную роль в переносе электронов внутри ком-

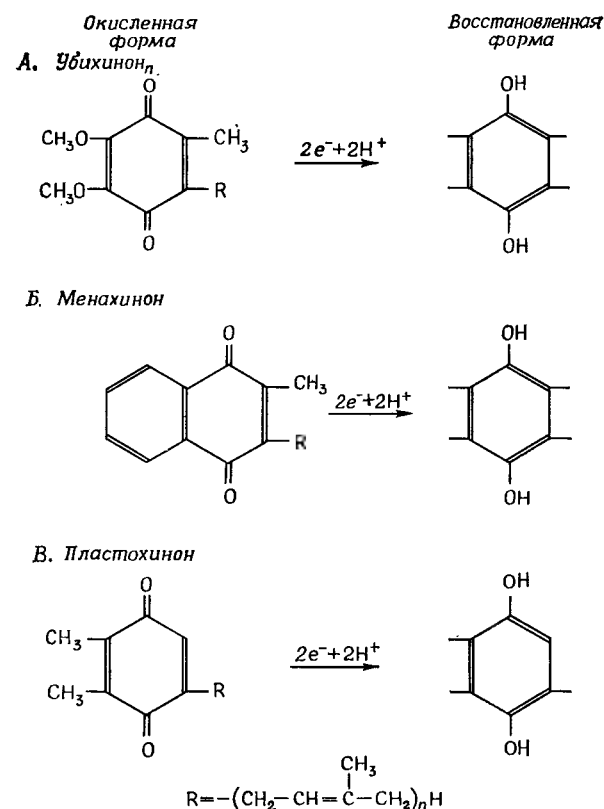


Рис. 5.8. Убихинон и сходные с ним редокс-переносчики.

плекса III (разд. 5.8). Хотя UQ_{10} является природным медиатором, его высокая гидрофобность затрудняет использование этого соединения в экспериментальной работе. Обычно в опытах используют убихиноны с более короткой боковой цепью, которые лучше растворяются в воде.

В некоторых анаэробных электронтранспортных цепях роль UQ играет менахинон (разд. 5.12). В хлоропластах аналогичным редокс-переносчиком (разд. 6.4) служит пластохинон (рис. 5.8).

5.3. ЛИНЕЙНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕДОКС-ПЕРЕНОСЧИКОВ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Последовательность электронных переносчиков в дыхательной цепи митохондрий (рис. 5.1) в основном была выяснена к началу 60-х годов с помощью полярографии (разд. 4.5) и спектроскопических методов. Эти исследования были значительно облегчены тем, что существует возможность подавать электроны в цепь и акцептировать их в ряде точек вдоль цепи, которые соответствуют связующим участкам между дыхательными комплексами. Так, $NADH$ восстанавливает комплекс I, сукцинат — комплекс II и тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD) — цитохром-оксидазу (рис. 4.2). Вместе с TMPD обычно добавляют аскорбат, который поддерживает медиатор в восстановленной форме. Феррицианид является неспецифическим и непроницающим акцептором электронов. Он может быть использован не только для изучения отдельных участков цепи, но и для определения ориентации некоторых компонентов в мембране (Klingenberg, 1979).

Открытие специфических ингибиторов переноса электронов позволило использовать кислородный электрод для определения относительного расположения точек входа электронов в цепь и действия ингибиторов (рис. 5.9). Далее с помощью спектрального анализа можно было определить положение всех редокс-переносчиков относительно этих точек.

Новые возможности для выяснения порядка расположения редокс-компонентов появились благодаря развитию техники, позволившей исследовать кинетику окисления дыхательной цепи после добавления кислорода к анаэробной суспензии митохондрий (рис. 5.4). Последовательность окисления компонентов отражала порядок их расположения по отношению к терминальной оксидазе. Этот подход позволил также определить, способен ли кинетически данный компонент обеспечить перенос электронов по основному пути. Высокие скорости окисления в этих условиях потребовали использования техники остановленной струи (стоп-флоу) (рис. 5.4) для быстрого запуска реакции.

Переносчики в дыхательной цепи должны располагаться в такой последовательности, чтобы их редокс-потенциалы E_h постепенно возрастали от $NADH$ до O_2 . Величина E_h определяется

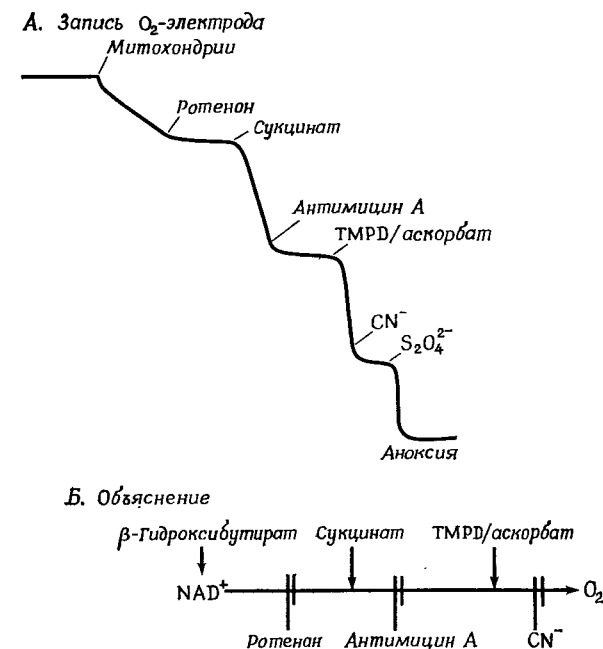


Рис. 5.9. Типичный эксперимент по измерению скорости дыхания с помощью кислородного электрода, который позволяет определить относительное расположение мест действия ингибиторов и точек подачи электронов в дыхательной цепи. Митохондрии печени инкубировали в среде, насыщенной воздухом и содержащей FCCP [протонофор, позволяющий создать условия, при которых протонная проводимость митохондрий не является фактором, лимитирующим скорость (разд. 2.5.3)]. Исходно в среде присутствует NAD^+ -зависимый субстрат — β -гидроксibuтират. Ротенон (1 мкМ) полностью ингибирует дыхание, но не препятствует окислению сукцината. Антимицин А блокирует окисление сукцината, но не аскорбата в присутствии TMPD. Цианид является ингибитором и в последнем случае. Дитионит ($S_2O_4^{2-}$) добавлен, чтобы неферментативным путем вызвать аноксию.

потенциалом полувосстановления (E_m) и степенью восстановленности переносчика [уравнение (3.19)]. Последнюю величину легко можно определить спектроскопически, но измерение потенциала полувосстановления *in situ* возможно лишь с помощью непрямых методов. Надо отметить, что потенциал полувосстановления компонента в составе дыхательной цепи обычно отличается от величины, характерной для очищенного белка в растворе.

Метод редокс-потенциометрии (Dutton, Wilson, 1976; Dutton, 1978) объединяет двухволновую спектроскопию и определение редокс-потенциалов (разд. 3.3). Как и в случае редокс-потен-

циометрии большинства других биологических систем, в исследованиях дыхательной цепи приходится применять промежуточные редокс-пары, которые в низких концентрациях ускоряют установление равновесия между платиновым электродом и первичной парой. Такой медиатор эффективно работает лишь в области своего потенциала полувосстановления, когда и окисленная, и восстановленная формы присутствуют в заметных концентрациях. Поэтому при изучении дыхательной цепи приходится использовать набор редокс-медиаторов, перекрывающих весь диапазон потенциалов с интервалом около 100 мВ. Медиаторы обычно используются в концентрации от 10^{-6} до 10^{-4} М. Многие медиаторы аутоокисцабельны, поэтому измерения проводятся в анаэробных условиях. Это позволяет также предотвратить перенос электронов по цепи, нарушающий равновесие.

Для того чтобы уравниваться со всеми связанными с мембраной компонентами, медиаторы должны быть проникающими веществами. Особенно большие затруднения возникают при работе с энергизованными митохондриями (например, в присутствии АТФ, если поддерживается анаэробноз). В этих условиях $\Delta\phi$ или ΔpH могут сказываться на распределении окисленной и восстановленной форм медиаторов по обе стороны мембраны, так что соотношение этих форм на стороне исследуемого компонента цепи будет отличаться от соотношения форм на платиновом электроде. Таким образом, интерпретация АТФ-зависимых эффектов достаточно сложна. Указанный артефактный эффект следует отличать от истинного эффекта, связанного с перераспределением электронов в мембране в ответ на генерацию мембранного потенциала или с энергозависимым изменением величины E_m (Hinkle, Mitchell, 1970; Walz, 1979). Простейшие эксперименты по редокс-потенциометрии проводятся на деэнергизованных митохондриях или на субмитохондриальных частицах.

Практически определение величины E_m различных компонентов дыхательной цепи производится следующим образом (рис. 5.10). Митохондрии инкубируют в анаэробных условиях в присутствии вторичных медиаторов. Степень восстановленности исследуемого компонента определяют с помощью двухлучевой спектроскопии, а редокс-потенциал среды измеряют платиновым или золотым электродом. При этом медиатор обеспечивает равновесие между компонентами цепи и электродом при данном значении E_h . Эта величина может быть изменена как в отрицательную сторону (при добавлении аскорбата, NADH или дитионита), так и в положительную при добавлении феррицианида. Одновременное измерение величины E_h и степени восстановленности компонента цепи позволяет провести его полное редокс-титрование.

Подобное титрование дает возможность получить очень су-

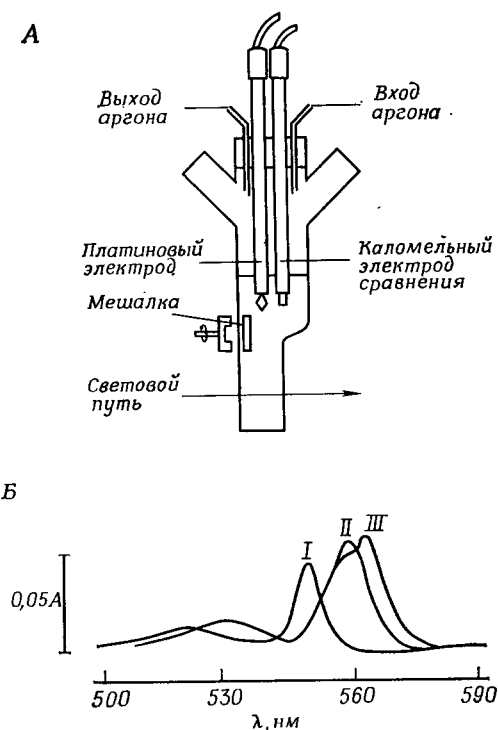


Рис. 5.10. Редокс-потенциометрия компонентов дыхательной цепи (Dutton, 1978). А. Прибор для одновременного определения редокс-потенциала и поглощения. Б. Дифференциальный спектр сукцинат: (цитохром *c*) оксидоредуктазы (т. е. комплексов II+III). Комплекс, который поддерживается в растворе благодаря низким концентрациям тритона X-100 и дезоксихолата, был добавлен в анаэробных условиях в среду инкубации, содержащую редокс-медиаторы. Редокс-потенциал среды варьировали с помощью добавления порций феррицианида. I — спектр при +145 мВ, когда цитохром c_1 восстановлен (базовая линия при +280 мВ, когда все цитохромы окислены); II — спектр при -10 мВ, когда восстановлен цитохром b_{562} (базовая линия при +145 мВ, когда восстановлен лишь цитохром *c*); III — спектр при -100 мВ, когда восстановлен цитохром b_{566} (базовая линия при -10 мВ, когда восстановлены цитохромы c_1 и b_{562}).

ществленную информацию. Кроме собственно измерения потенциала полувосстановления по наклону графика зависимости редокс-потенциала (E_h) от логарифма отношения концентраций окисленной и восстановленной форм можно определить, является ли данный компонент одноэлектронным (60 мВ на изменение $[ox]/[red]$ в 10 раз) или двухэлектронным (30 мВ) переносчиком. Повторяя редокс-титрование при различных pH, можно определить, зависит ли потенциал полувосстановления данного

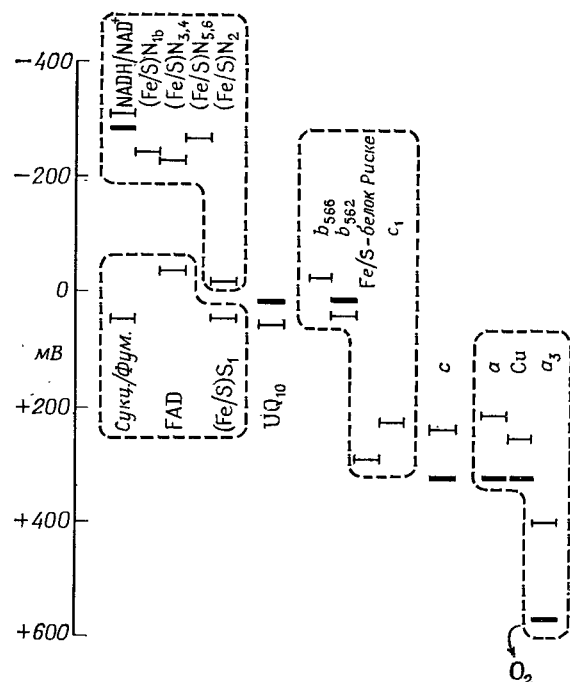


Рис. 5.11. Значения E_m и E_h в состоянии 4 для компонентов дыхательной цепи митохондрий (Erecinska et al., 1974; Dutton, Wilson, 1974). Все значения приведены для митохондрий сердца. Величины E_m (—), полученные для деэнергизованных митохондрий, и E_h (—) — для митохондрий, окисляющих β -гидроксibuтират в состоянии 4, рассчитаны, исходя из значений E_m (в деэнергизованных митохондриях) и степени восстановления компонентов в состоянии 4. Предполагается, что никаких энергезависимых изменений потенциалов полувосстановления не происходит.

компонента от рН, и, следовательно, переносится ли при его работе ($H^+ + e^-$). Наконец, этот метод часто позволяет различить два или более компонента с равными E_m в одном спектральном пике. В этом случае кривая титрования представляет собой сумму двух нернстовых кривых (рис. 3.3) с различными величинами E_m . Одно из наиболее интересных открытий, сделанных с помощью этого метода, состояло в том, что цитохром b в комплексе III был разделен на два компонента (разд. 5.8). Редокс-потенциометрию используют и при исследовании Fe/S-белков. В этом случае редокс-состояние компонента определяют по сигналу ЭПР.

Потенциалы полувосстановления идентифицированных компонентов дыхательной цепи представлены на рис. 5.11. Указанные значения E_m определены для недышащих митохондрий. Для

того чтобы определить величину E_h любого компонента в процессе дыхания, необходимо просто определить степень его восстановления. Эти величины для дышащих митохондрий в состоянии 4 также показаны на рис. 5.11. Редокс-компоненты в цепи распадаются на четыре эквипотенциальные группы. Скачки потенциалов между ними соответствуют участкам, где происходит транслокация протонов. Выделяемая на этих участках энергия (падение E_h электронов) запасается в форме протонного электрохимического потенциала.

5.4. ТРАНСЛОКАЦИЯ ПРОТОНОВ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ; СТРУКТУРНЫЕ ПРЕДСКАЗАНИЯ, ВЫТЕКАЮЩИЕ ИЗ МОДЕЛИ «ПЕТЕЛЬ» И МОДЕЛИ «КОНФОРМАЦИОННЫХ ПОМП»

(Обзоры: Greville, 1969; Mitchell, 1976b, 1979a; Papa, 1976; Wikström, Krab, 1979)

Альтернативные гипотезы о механизме транслокации протонов при работе дыхательной цепи были представлены на рис. 4.10 в связи с вопросом о стехиометрии $H^+/2e^-$. Прямой механизм петель в дыхательной цепи, предложенный Митчеллом, включает ряд определенных экспериментально проверяемых предсказаний. Согласно модели петель, выброс протонов происходит в результате переноса электронов от переносчика H -атомов ($H^+ + e^-$) к чисто электронному переносчику, при котором протоны освобождаются на наружной поверхности мембраны. Далее электроны переносятся от чисто электронного переносчика к следующему переносчику H -атомов, и это сопровождается захватом протонов из матрикса (рис. 4.10). Отсюда следует, что в цепи должна соблюдаться строгая стехиометрия $2H^+/2e^-$ на петлю (разд. 4.3), в линейной последовательности переносчиков должны правильно чередоваться переносчики двух типов, а их расположение в мембране должно соответствовать наблюдаемому направлению переноса протонов. Напротив, модель конформационных помп значительно менее определена и может быть использована для объяснения практически любых экспериментальных данных.

Основной проблемой в гипотезе петель является отсутствие доказательств существования достаточного числа переносчиков ($H^+ + e^-$) в дыхательной цепи. В цепи найдены лишь два явных переносчика ($H^+ + e^-$): FMN в комплексе I (разд. 5.6) и UQ_{10} . Обнаружено также около 15 возможных переносчиков электронов (до 8 Fe/S-белков, 5 цитохромов и 2 атома Cu). Одним из решений этой проблемы явилась гипотеза протондвижущего Q-цикла (разд. 5.8), в котором UQ_{10} играет роль переносчика ($H^+ + e^-$) сразу в двух петлях.

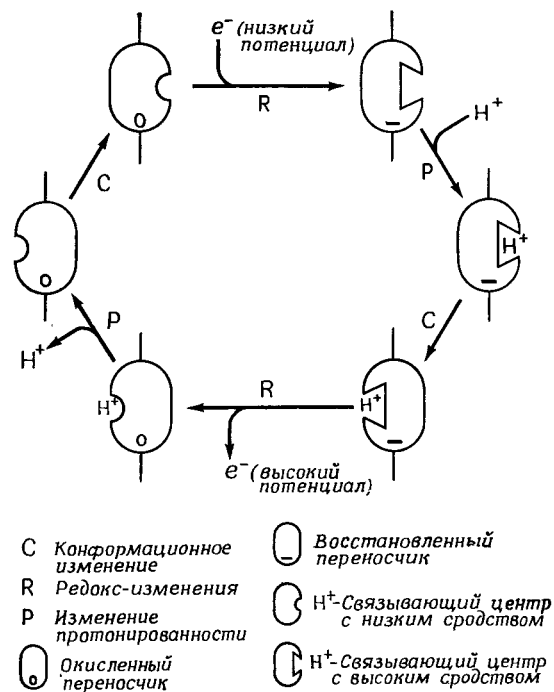


Рис. 5.12. Модель редокс-зависимой протонной помпы (Wikström, Krab, 1979). Показана одна из гипотетических моделей протонной помпы со стехиометрией $1\text{H}^+/1\text{e}^-$. Помпа может существовать в восьми различных состояниях (возникающих в результате комбинации двух конформаций, двух редокс-состояний и двух степеней протонирования). Для того чтобы происходил векторный перенос протонов, должны быть разрешены лишь некоторые из возможных переходов между этими восемью состояниями.

Иногда можно встретить утверждения, что гипотеза петель требует, чтобы петли полностью пересекали мембрану и соответствующие редокс-переносчики выходили на ее наружную поверхность. Однако для функционирования петли необходима лишь возможность выхода протонов на наружную сторону мембраны. Можно предполагать, что все редокс-переносчики расположены вблизи от внутренней поверхности мембраны и перенос протонов осуществляется с помощью специальных протонных каналов, аналогичных компоненту F_0 АТФ-синтетазы (разд. 7.3).

Хотя обычно принято противопоставлять две гипотезы о механизме транслокации протонов в дыхательной цепи, различия между ними не следует преувеличивать. Так, гипотеза петель предполагает, что у некоторых редокс-переносчиков меняется значение pK при восстановлении, что приводит к захвату двух

протонов на два электрона из матрикса. Последующее реокисление переносчика вызывает понижение pK и освобождение протонов во внешнюю среду. Такие же направленные изменения pK являются неперменной частью любого гипотетического механизма конформационной помпы. В этом случае, однако, не требуется предполагать присоединения протонов и электронов к одному и тому же компоненту. Напротив, редокс-компонент должен быть отделен от протонпереносящего. Свободная энергия, освобождаемая при редокс-переходе, передается с помощью конформационных изменений ко второму компоненту, который в результате меняет конформацию и pK . Поскольку этот компонент может не иметь редокс-свойств, выбор кандидатов оказывается неограниченным. Отпадают также и стехиометрические ограничения. Действительно, нет причин, почему двухэлектронное восстановление переносчика не может индуцировать конформационный переход, приводящий к изменению pK трех или более групп в другом белке, хотя ни один из известных редокс-переносчиков и не связывает более 2H^+ на 2e^- .

В конформационной помпе должны координированно происходить редокс-изменения, конформационные изменения и изменения степени протонирования групп. Следовательно, даже в простейшей модели имеется $2^3 = 8$ гипотетических состояний, связанных взаимными переходами. Векторная транслокация протонов позволяет ограничить число возможных переходов, как это показано на рис. 5.12.

5.5. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И РЕКОНСТРУКЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

[Обзоры: Hatefi, 1978; Hatefi et al., 1962 (выделение комплексов); Kagawa, 1972; Racker, 1979 (выделение и реконструкция)]

Использование желчных солей, таких, как холат и дезоксихолат, при низких температурах позволяет разрушать липид-липидные взаимодействия в мембранах и в то же время сохранять интактные белок-белковые комплексы. С помощью этих детергентов дыхательную цепь митохондрий можно разделить на четыре комплекса, названные комплексами I, II, III и IV (цитохром c -оксидаза). При этом сохраняется электронтранспортная активность каждого комплекса, а после встраивания этих комплексов в искусственные бислоиные мембраны восстанавливается их протонпереносящая активность. С помощью фракционирования и реконструкции комплексов достигается ряд целей: 1) снижается сложность системы по сравнению с интактными митохондриями; 2) становится возможным определение минимального числа компонентов, необходимых для работы каждого участка цепи; 3) в период проверки хемиосмотической теории

метод реконструкции дал наиболее убедительные доказательства отсутствия необходимости прямой химической или структурной связи между дыхательной цепью и АТР-синтетазой. Так, например, оказалось, что можно «реконструировать» синтез АТР в системе, содержащей такие неродственные комплексы, как АТР-синтетаза из митохондрий сердца быка и светозависимая H^+ -помпа из галобактерий (разд. 6.6), включенные в общий липидный бислой.

При фракционировании митохондриальной дыхательной цепи было обнаружено, что она содержит два моля комплекса IV на моль комплекса III. Комплексы I и II присутствовали в значительно меньших количествах. Изолированные комплексы легко reagregировали. Например, в присутствии фосфолипидов и UQ_{10} комплексы I и III спонтанно агрегировали и при этом восстанавливалась NADH-цитохром *c*-оксидоредуктазная активность (Ragan, Hegerl, 1978).

Метод реконструкции был впервые разработан Рэкером и Кагавой. Уже после выделения чистого комплекса при реконструкциях возникает ряд технических проблем. Во-первых, после встраивания в бислой комплекс должен сохранять каталитическую активность. Во-вторых, следует учитывать, что после реконструкции протонные помпы могут быть ориентированы в мембране случайным образом, что затрудняет измерение их протонпереносящей активности. Для включения комплексов в везикулы их обычно суспендируют в смеси холата и фосфолипидов, а затем медленно удаляют детергент с помощью диализа. Везикулы с встроенными в мембрану комплексами образуются самопроизвольно. Другой метод состоит в том, что комплексы в смеси с фосфолипидами обрабатывают ультразвуком (разд. 1.4).

5.6. КОМПЛЕКС I [НАДН-ДЕГИДРОГЕНАЗА(ХИНОН)]

[Обзоры: Ragan, 1976 (свойства); Hatefi, 1978 (выделение)]

Комплекс I катализирует перенос двух электронов от NADH на UQ_{10} , что соответствует $\Delta E_{h,7} \approx 310$ мВ (рис. 5.11). Он способен переносить протоны — это было показано как на intactных митохондриях, так и на реконструированной системе, где в качестве акцептора электронов использовали окисленный хинон. При окислении NAD^+ -зависимых субстратов наблюдаются более высокие соотношения H^+/O (разд. 4.3) и ADP/O (разд. 4.6), чем в случае сукцината, который подает электроны на UQ_{10} через комплекс II, не способный переносить протоны.

Комплекс I имеет мол. массу $\sim 850\,000$ и, возможно, является самым большим белковым комплексом во внутренней мембране митохондрий. Он содержит по крайней мере 16 полипептидов,

большинство из которых не участвует непосредственно в редокс-превращениях. NADH окисляется на внутренней стороне мембраны (обращенной в матрикс) с помощью FMN-содержащего фермента — NADH-дегидрогеназы. Intактные митохондрии в отличие от вывернутых субмитохондриальных частиц не способны окислять добавленный NADH. Комплекс I содержит от 16 до 28 атомов Fe и кислотолабильных атомов S (на моль FMN), которые собраны в кластеры, содержащие 2 или 4 атома Fe. С помощью низкотемпературного ЭПР и редокс-потенциометрии (рис. 5.11) можно обнаружить от 4 до 7 Fe/S-центров на моль комплекса I. Все центры имеют очень низкие потенциалы полувосстановления: от -240 до -380 мВ, за исключением центра N-2, для которого $E_{m,7} \approx -80$ мВ.

Активность комплекса I может быть ингибирована ротеноном или пьерицидином А. Точное место связывания ротенона не известно. Однако, поскольку в присутствии ингибитора как FMN, так и Fe/S-центры оказываются восстановленными, можно полагать, что он блокирует последние стадии переноса электронов на UQ_{10} .

Непроникающий и неспецифический акцептор электронов — феррицианид — не взаимодействует с комплексом I в intactных митохондриях, но катализирует быстрое и нечувствительное к ротенону окисление NADH в вывернутых субмитохондриальных частицах.

5.7. КОМПЛЕКС II [СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА]; ЭЛЕКТРОНПЕРЕНОСЯЩИЙ ФЛАВОПРОТЕИН И α -ГЛИЦЕРОФOSFATДЕГИДРОГЕНАЗА

[Обзор: Hatefi, 1978 (выделение)]

Кроме комплекса I существуют еще три пути переноса электронов к UQ_{10} и комплексу III: с помощью комплекса II, переносащего электроны от сукцината, с помощью электронпереносящего флавопротеина, который получает электроны на флавинзависимой стадии β -окисления жирных кислот, и с помощью α -глицерофосфатдегидрогеназы, катализирующей внемитохондриальное окисление α -глицерофосфата до дигидроксиацетонфосфата.

Две первые системы локализованы на внутренней стороне мембраны, а третья — на наружной. Все три являются флавопротеиновыми системами, переносящими электроны от субстратных пар, имеющих потенциалы полувосстановления, близкие к 0 мВ. Как следует из термодинамики, ни одна из них не может переносить протоны.

Комплекс II состоит по крайней мере из четырех полипептидов (табл. 5.1). Два больших полипептида составляют сукцинатдегидрогеназу. Большой из них содержит ковалентно связанный

Таблица 5.1

Функциональные комплексы дыхательной цепи в митохондриях

Комплекс	Число субъединиц	Простетические группы	Перенос H^+
I NADH-дегидрогеназа (хинон), мол. масса 850 000	16	1 FMN, 16—24 атома негемового железа (5—7 центров)	Есть
II Сукцинатдегидрогеназа, мол. масса 97 000	2	1 FAD, 8 атомов негемового железа (3 центра)	Нет
III UQH_2 -цитохром <i>c</i> -оксидоредуктаза, мол. масса 280 000	6—8	2 гема типа <i>b</i> 1 гем типа <i>c</i> 2 атома негемового железа (1 центр)	Есть
IV Цитохром <i>c</i> -оксидаза, мол. масса 200 000	6—7	2 гема типа <i>a</i> 2 атома Cu	Есть ¹

¹ Данные относительно переноса протонов (или только электронов) цитохромоксидазой противоречивы (разд. 5.9).

Цитохромы присутствуют в цепи в следующих стехиометрических соотношениях: $\{b:c_1:c:a:a_2 = 2:1:2:2:2$. Приблизительное молярное соотношение комплексов I:II:III:IV = 0,1:0,1:0,5:1.

FAD и два Fe/S-центра, второй содержит еще один центр. Комплекс II содержит цитохром *b* в количестве, эквимольном FAD, причем этот цитохром, ассоциированный с меньшими полипептидами, отличается от цитохрома *b* комплекса III (разд. 5.8). Функции цитохрома *b* комплекса II пока не выяснены.

5.8. УБИХИНОН И КОМПЛЕКС III

{*bc*₁-КОМПЛЕКС, ИЛИ UQ-ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДОРЕДУКТАЗА}

[Обзоры: Hatefi, 1978 (выделение); Wikström, 1973; Пара, 1976, Rieske, 1976 (свойства)]

Хотя UQ является самым низкомолекулярным редокс-компонентом дыхательной цепи, вопрос о его роли остается, пожалуй, наиболее спорным. Простейшее предположение состоит в том, что этот гидрофобный кофермент играет роль «пула водорода», т. е. работает как подвижный переносчик двух H-атомов ($2H^+ + 2e^-$), соединяющий комплексы I и II с комплексом III. Однако гипотеза протондвижущего Q-цикла предполагает, что UQ_{10} осуществляет перенос H-атомов внутри самого комплекса III.

Комплекс III состоит из 8 субъединиц, включая 2 моля цитохромов *b* и 1 моль цитохрома *c*₁. Долгое время считалось, что комплекс содержит цитохромы *b* двух различных типов: цитохром *b* одного из них восстанавливается сукцинатом, а друго-

го — лишь в присутствии дитионита. Кроме того, для цитохромов *b* этих двух типов были зарегистрированы различные спектры как в intactных митохондриях, так и в очищенном комплексе. Наконец, они имели различные потенциалы полувосстановления, и эта разница сохранялась даже в выделенных димерах цитохромов (von Jagow et al., 1978). Эти цитохромы были названы *b_K* или *b₅₆₂* — цитохром, восстанавливаемый сукцинатом, и *b_T* или *b₅₆₆* — цитохром, который восстанавливается лишь дитионитом. В дальнейшем, однако, генетические исследования на митохондриях дрожжей показали, что апобелки обоих цитохромов кодируются одним структурным геном и, следовательно, являются структурно идентичными субъединицами димера. В этом случае различное поведение цитохромов в димере, по-видимому, связано с взаимодействиями мономеров.

Потенциалы полувосстановления цитохромов *b₅₆₆* и *b₅₆₂* составляют ~—30 и +30 мВ соответственно (рис. 5.11). Оба компонента глубоко погружены в мембрану и недоступны для неспецифического акцептора электронов — феррицианида ни в intactных митохондриях, ни в вывернутых субмитохондриальных частицах. Генерация мембранного потенциала при гидролизе АТР или образовании диффузионного потенциала K^+ (разд. 3.6) приводит к восстановлению цитохрома *b₅₆₆* относительно цитохрома *b₅₆₂*; кажущаяся величина $E_{h,7}$ цитохрома *b₅₆₆* возрастает от —40 до +70 мВ. Этот факт указывает на возможное расположение двух компонентов на разных сторонах мембраны. Образование мембранного потенциала приводит к смещению электронов от цитохрома *b₅₆₂* на внутренней стороне к цитохрому *b₅₆₆* на наружной стороне мембраны.

Кроме цитохромов *b* комплекс III содержит цитохром *c*₁ и Fe/S-белок с очень высоким положительным зарядом (белок Риске), в котором находятся 2FeS-центра. В него входит также несколько так называемых структурных белков, которые не участвуют в редокс-переходах, но, возможно, осуществляют перенос протонов. Большое повышение E_h между цитохромами *b* и *c*₁ указывает на то, что перенос электронов на этом участке тесно связан с генерацией $\Delta\mu_{H^+}$.

Цитохром *c*₁, выделенный из митохондрий сердца быка, имеет мол. массу 31 000. В отличие от изолированного белка цитохром *c*₁ in situ нечувствителен к действию трипсина и, по-видимому, является интегральным белком. Цитохром *c*₁ имеет спектр, который можно отличить от спектра цитохрома *c* лишь при низкой температуре (разд. 5.2). Цитохром *c* — это периферический белок, связывающийся на наружной стороне мембраны. При наложении мембранного потенциала относительное редокс-состояние цитохромов *c* и *c*₁ меняется мало. Это указывает на то, что цитохром *c*₁ также расположен вблизи наружной сто-

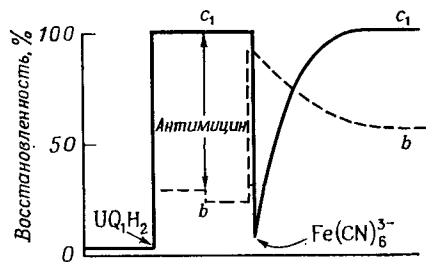


Рис. 5.13. Действие антимицина А и феррицианида на восстановление цитохромов в очищенном комплексе III (Rieske, 1971). Очищенный комплекс III, который находится в растворе благодаря холату, был восстановлен с помощью UQ_1H_2 [водорастворимый аналог $UQ_{10}H_2$ (разд. 5.2)]. Хинон полностью восстановил цитохром c_1 и лишь на 30% — цитохром b . Добавление антимицина приводит лишь к небольшим изменениям, однако после добавления феррицианида, который должен окислить весь комплекс, наблюдается окисление цитохрома c_1 и частичное восстановление цитохромов b . Поскольку хинон был в избытке по отношению к феррицианиду, по мере истощения окислителя наблюдалось обращение вызванных им эффектов.

роны мембраны. Между белком Риске и цитохромом c_1 существует быстро устанавливающееся редокс-равновесие.

Комплекс III ингибируется антимицином А в очень низких концентрациях при связывании одного моля ингибитора на моль фермента. Место действия антимицина А точно не известно, так же как не ясен путь переноса электронов в комплексе III. Ингибитор повышает восстановленность цитохромов b и предотвращает восстановление цитохрома c_1 , когда донором электронов служит UQ. При этом увеличивается также потенциалзависимое перераспределение электронов между цитохромами b_{566} и b_{562} . В то же время добавление акцептора электронов, такого, как феррицианид, приводит в присутствии антимицина не только к окислению цитохрома c_1 , но и к аномальному восстановлению цитохромов b . Этот удивительный эффект не зависит от $\Delta\psi$ и может наблюдаться на изолированном комплексе (рис.

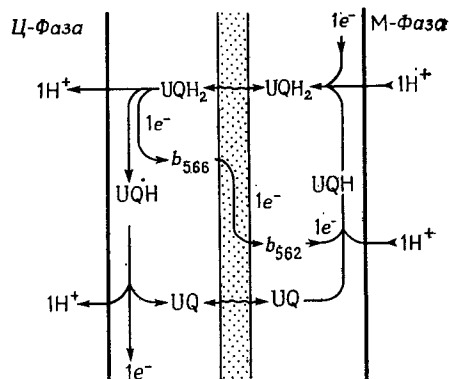
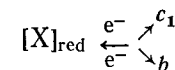


Рис. 5.14. Протоидвижущий Q-цикл (Mitchell, 1975b).

5.13.). Его простейшее объяснение состоит в том, что поток электронов в данных условиях разветвляется:



Если такой перенос электронов от неизвестного донора к цитохромам близок к равновесию в присутствии антимицина А, то окисление цитохрома c_1 приведет к сдвигу равновесия в сторону восстановления цитохромов b .

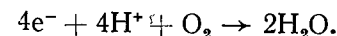
Отсутствие второго переносчика H-атомов, а также аномальное поведение цитохромов в присутствии антимицина А заставили Митчелла модифицировать схему классической «петли» (рис. 4.10) и предположить существование протондвижущего Q-цикла (Mitchell, 1975b), в котором UQ окисляется и восстанавливается в две стадии с образованием свободного радикала семихинона UQH (рис. 5.14). Семихинон — это очень реакционноспособное вещество, которое быстро дисмутирует с образованием UQ и UQH_2 . В митохондриях, однако, он стабилизирован за счет окружения и может быть обнаружен по сигналу ЭПР. В рамках Q-цикла сохраняется порядок взаимодействия цитохромов, предложенный выше, а также объясняется аномальное восстановление цитохромов b при окислении цитохрома c_1 в присутствии антимицина А.

5.9. ЦИТОХРОМ c И КОМПЛЕКС IV

(ЦИТОХРОМ c —ОКСИДАЗА, ФЕРРОЦИТОХРОМ c : O_2 ОКСИДОРЕДУКТАЗА)

[Обзоры: Hatefi, 1978 (выделение); Wikström, Krab, 1979 (перенос протонов)]

Комплекс III переносит электроны на цитохром c . Последний нельзя выделить в виде компонента комплекса, поскольку он легко отделяется от цитохром c —оксидазы. Однако выделенный цитохром c способен стехиометрически связываться с цитохром c — оксидазой. Цитохром c представляет собой периферический белок, локализованный на наружной поверхности мембраны, и его легко отделить от интактных митохондрий. Цитохромоксидаза — терминальный комплекс дыхательной цепи — катализирует восстановление O_2 до $2H_2O$ с переносом четырех электронов:



Естественным донором электронов служит цитохром c . Искусственным донором электронов может служить тетраметил- n -фенилендиамин (TMPD), который в свою очередь восстанавлива-

ется аскорбатом (разд. 4.1). В реакции с переносом четырех электронов участвуют четыре одноэлектронные редокс-группы комплекса: два гема (цитохромы a и a_3) и два атома меди, способные восстанавливаться до Cu^+ . Два цитохрома можно различить благодаря специфической способности цитохрома a_3 связывать такие лиганды, как CO . В то же время, как и в случае цитохромов b , неясно, являются ли цитохромы a и a_3 химически различными молекулами. В отличие от цитохромов b и c , где обе непорфириновые координационные связи железа заняты остатками аминокислот, в цитохромах a , как и в гемоглобине, имеется одна свободная координационная связь, что позволяет гему a_3 связывать O_2 и ингибиторы: CO , CN^- и N_3^- .

Электроны, поступающие в комплекс, имеют потенциал $E_{h,7} \simeq +290$ мВ, если митохондрии находятся в состоянии 4 (рис. 5.11). Затем они передаются на пару $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$, которая в среде, насыщенной воздухом, имеет $E_{h,7} \simeq +750$ мВ. Таким образом, перепад редокс-потенциалов $\Delta E_{h,7}$ составляет ~ 460 мВ. В этих условиях энергия, выделяемая при переносе двух электронов, достаточна для переноса четырех протонов через мембрану против $\tilde{\mu}_{\text{H}^+} = 230$ мВ (разд. 3.8). Хотя давно установлено, что в комплексе IV происходит превращение энергии, вопрос о стехиометрии и механизме переноса протонов остается открытым. В отличие от остальных комплексов дыхательной цепи цитохромоксидаза катализирует реакцию только в одном направлении.

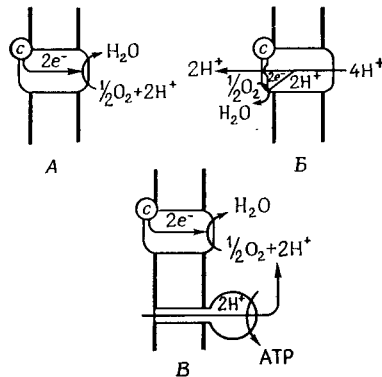


Рис. 5.15. Электронтранспортная модель и модель протонной помпы для цитохромоксидазы. А. Электронтранспортная модель (Mitchell, 1966). Стехиометрия: $q+/2e^- = 2$; $2\text{H}^+/2e^-$ (поглощение протонов из матрикса); в цитозоль протоны не выбрасываются. Б. Модель протонной помпы (Wikström, Krab, 1979): $q+/2e^- = 4(6)$; $4(6)\text{H}^+/2e^-$ — поглощение из матрикса и $2(4)\text{H}^+/2e^-$ — выброс в цитозоль. В. Несмотря на то, что, согласно модели (А), протоны не переносятся через мембрану, транспорт электронов может быть сопряжен с синтезом АТФ.

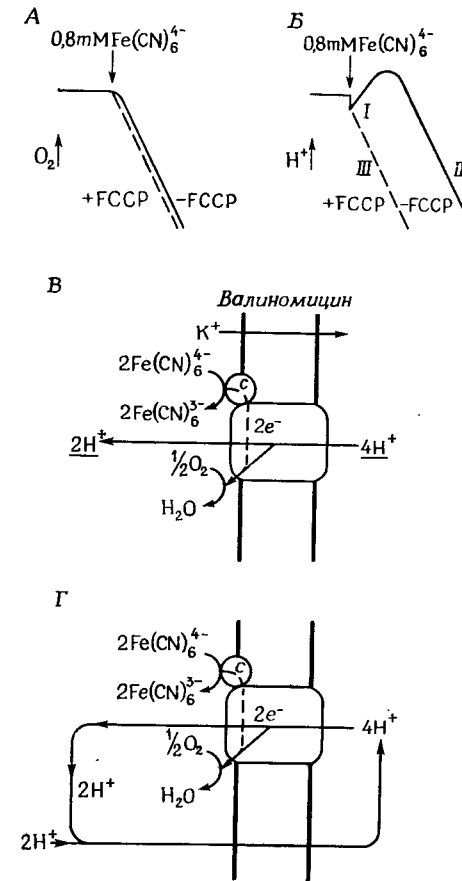


Рис. 5.16. Перенос протонов цитохромоксидазой (Wikström, Krab, 1978). Митохондрии печени крысы добавляли в среду с низкой буферной емкостью, содержащую KCl (для поддержания осмотического равновесия); валиномицин (для компенсации переноса зарядов при начальном выбросе H^+), ротенон и антимицин А (чтобы предотвратить перенос электронов на других участках дыхательной цепи). Для восстановления цитохрома с добавляли ферроцианид: после отброса пера самописца, обусловленного этой добавкой, наблюдалось закисление среды (I), которое затем сменялось постоянным защелачиванием (II), так как протоны проникали обратно в матрикс. В присутствии протонофора (III) наблюдалось лишь поглощение H^+ . А. Запись с помощью O_2 -электрода. Б. Запись с помощью pH-электрода. В. Начальные условия. Г. Стационарные условия.

Схемы двух гипотез о механизме работы комплекса IV представлены на рис. 5.15. Исходное предположение Митчелла состояло в том, что цитохромоксидаза работает как электронпереносная ветвь последней редокс-петли (рис. 4.10). В альтерна-

тивной гипотезе предполагается, что фермент работает как протонная помпа, в которой перенос протонов через мембрану вызывается конформационными изменениями, возникающими при переносе электронов. Хотя по модели Митчелла переноса протонов не происходит, но перенос электронов может быть сопряжен с синтезом АТФ, так как протоны, переносимые в матрикс через АТФ-синтазу, используются в процессе восстановления O_2 до H_2O (рис. 5.15).

Наиболее заметное различие между моделями состоит в том, что выброс протонов во внутримитохондриальную среду происходит лишь в случае работы протонной помпы (рис. 5.15). На первый взгляд кажется, что это предположение легко проверить, однако для доказательства того, что наблюдаемый выброс протонов связан с их векторным переносом, требуются значительные усилия. На рис. 5.16 показаны результаты одного из экспериментов по проверке этого предположения. Подробное их обсуждение можно найти в работе Мойл и Митчелла (Moyle, Mitchell, 1978b).

5.10. ТРАНСГИДРОГЕНАЗА НИКОТИНАМИДНУКЛЕОТИДОВ

(Обзор: Rydström, 1977)

Несмотря на то что потенциалы полувосстановления пар $NAD^+/NADH$ и $NADP^+/NADPH$ совпадают, вторая из них всегда восстановлена значительно сильнее в митохондриальном матриксе. Неравновесное состояние поддерживается энергозависимой трансгидрогеназой, которая катализирует следующую реакцию:



Соотношение действующих масс в реакции может превышать 500 как за счет работы дыхательной цепи (в этом случае олигомицин не действует), так и за счет гидролиза АТФ (в этом случае олигомицин ингибирует процесс). Это указывает на то, что трансгидрогеназа зависит от $\Delta\mu_{H^+}$, а не от АТФ.

Трансгидрогеназа состоит из одного большого полипептида с мол. массой 97 000 (Höjeberg, Rydström, 1979). Это мембранный фермент, который взаимодействует лишь с нуклеотидами матрикса. Опыты с трансгидрогеназой можно проводить только на вывернутых субмитохондриальных частицах.

Доказательства участия трансгидрогеназы в трансмембранном переносе зарядов были получены в опытах, где следили за перераспределением липофильных анионов (разд. 2.5) через мембрану субмитохондриальных частиц (рис. 5.17). Трансгидрогеназа представляет интересное исключение из правила, согласно которому на участке превращения энергии должна существовать разность потенциалов полувосстановления (рис. 5.11).

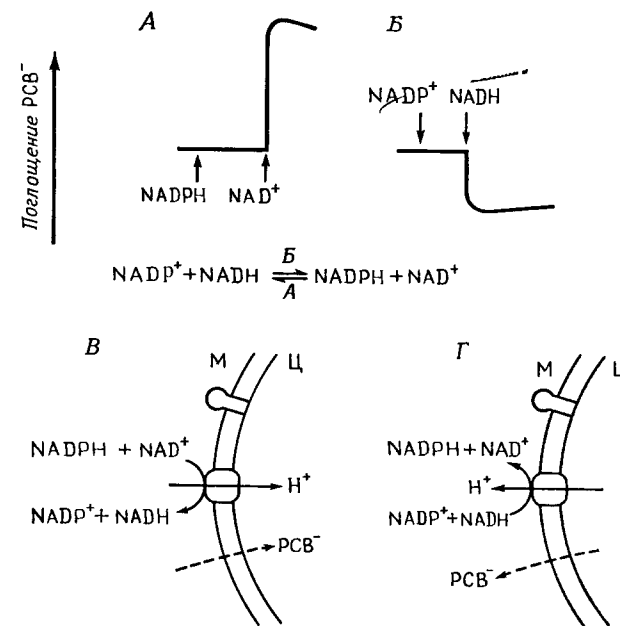


Рис. 5.17. Трансгидрогеназа никотинамидных нуклеотидов переносит заряды через мембрану (Skulachev, 1970). Субмитохондриальные частицы инкубировали в среде, содержащей буфер, сахарозу и ингибиторы дыхательной цепи — ротенон и CN^- . В среду был добавлен липофильный анион фенилдикарбаундекаборан (PCB^-) в концентрации 10^{-8} М. За изменениями его концентрации следили с помощью бислойной липидной мембраны. В опыте (А) трансгидрогеназа работает в обратном направлении и переносит протоны из внешней среды внутрь частиц (из М-фазы в Ц-фазу). В опыте (Б) трансгидрогеназа восстанавливает $NADP^+$ до $NADPH$ и переносит протоны наружу (в М-фазу для СМЧ). На схемах (В) и (Г) показаны ионные потоки, соответствующие опытам (А) и (Б).

5.11. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ В МИТОХОНДРИЯХ РАСТЕНИЙ

(Обзоры: Palmer, 1979; Moore, Rich, 1980)

Дыхание растительных митохондрий подавляется ионами CN^- лишь частично, что указывает на существование дополнительных терминальных оксидаз. Например, в митохондриях, выделенных из зрелых початков аронника *Arum maculatum*, устой-

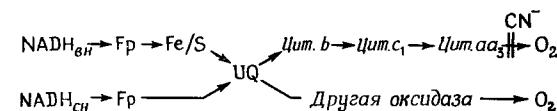


Рис. 5.18. Пути переноса электронов в растительных митохондриях.

чивый к ионам CN^- путь переноса электронов примерно в 10 раз более активен, чем путь через обычную цитохром *c*-оксидазу (рис. 5.18). В различные время высказывались предположения о том, что цианид-резистентная оксидаза является флавопротеином, содержит аутооксидабельные цитохромы типа *b* или Fe/S-белки, однако ее истинная природа неясна до сих пор. В случае митохондрий аронника путь электронов к дополнительной оксидазе ответвляется на уровне UQ, причем для него характерно отсутствие чувствительности к антимицину А. Этот альтернативный путь не связан с переносом протонов, так что эффективность сопряжения оказывается очень низкой. В результате такого дыхания выделяется тепло, что важно физиологически, так как при этом усиливается испарение аттрактантов для насекомых и повышается вероятность опыления. Этот механизм термогенеза интересно сравнить с механизмом, существующим в митохондриях бурого жира животных (разд. 4.5), где наряду с нормальным транспортом протонов существует высокая протонная утечка.

Растительные митохондрии отличаются также тем, что способны окислять экзогенный NADH, а окисление эндогенного NADH в них лишь частично блокируется ротеноном. Окисление двух пулов NADH катализируется различными ферментами; окисление экзогенного NADH активируется ионами Ca^{2+} и ингибируется внешним AMP или при окислении сукцината. Этот путь окисления не связан с переносом протонов.

Существование двух путей переноса электронов до UQ и двух путей от UQ до O_2 означает, что транспорт электронов может происходить по двум независимым цепям, которые соединяются только на уровне пула хинонов (рис. 5.18).

5.12. ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ЦЕПИ БАКТЕРИЙ

(Обзоры: Jones C. W., 1977; Haddock, Jones, 1977; Kröger, 1978; Haddock, 1980)

Дыхательные цепи бактерий имеют более сложную организацию, чем цепь митохондрий. Во-первых, в бактериях встречаются электронотранспортные цепи различных типов. Во-вторых, в некоторых бактериях свойства дыхательной цепи могут изменяться в ответ на изменение условий роста. В-третьих, многие бактериальные цепи ветвятся и оканчиваются различными акцепторами электронов. Эти сложности отражают большую изменчивость бактерий. Так, например, *E. coli*, выросшие в аэробных условиях, имеют линейную дыхательную цепь с цитохромом *o* в качестве терминальной оксидазы. Если количество кислорода в среде ограничено, то синтезируется вторая оксидаза — цитохром *d* — и поток электронов разветвляется. В условиях

строгого анаэробизма электроны могут переноситься на нитрат или фумарат. Еще большую изменчивость проявляют несерные пурпурные бактерии. Они имеют циклическую фотосинтетическую цепь переноса электронов при росте на свету и дыхательную цепь, оканчивающуюся O_2 , при росте в темноте. Эти две системы имеют ряд общих компонентов (разд. 6.3).

Дыхательные цепи бактерий, выросших в аэробных условиях, содержат редокс-переносчики, сходные, но не идентичные с переносчиками в митохондриях. Это Fe/S-белки, флавопротеины, хиноны и цитохромы. Лишь в немногих случаях, например у *Paracoccus denitrificans* (John, Whatley, 1977), сохраняется полная последовательность переносчиков, очень сходная с митохондриальной. Близкая гомология цепей позволяет предполагать, что митохондрии возникли в результате эндосимбиоза, а их бактериальные предки были сходны с *Paracoccus*.

У грамположительных бактерий функции убихинона выполняет менахинон (рис. 5.8), а во многих аэробных дыхательных цепях роль терминальной оксидазы вместо цитохромов *a* и *a₃* играют цитохром *o* или более цианидрезистентный цитохром *d*. Другим обычным отличием бактериальной дыхательной цепи от митохондриальной является отсутствие высокопотенциального

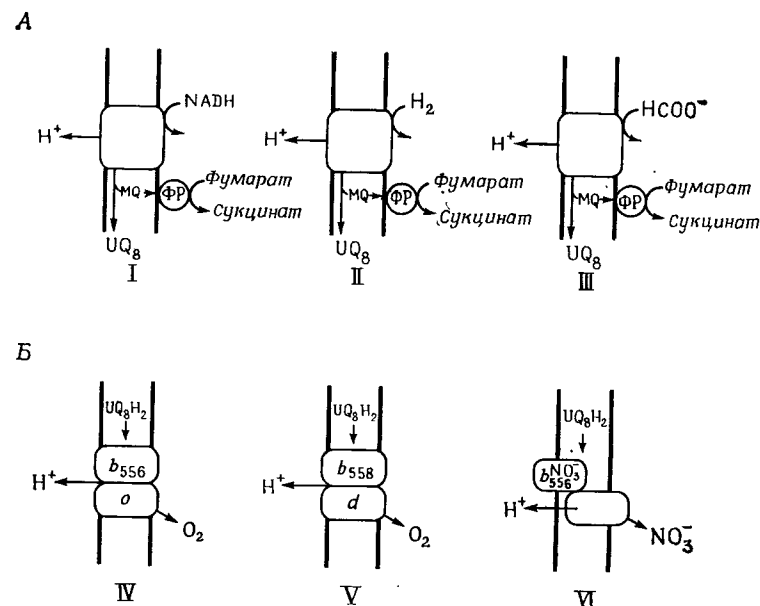


Рис. 5.19. Протонпереносящие участки в дыхательной цепи *E. coli* (Haddock, 1980). А. Низкопотенциальные. I — NADH-дегидрогеназа; II — гидрогеназа; III — форматдегидрогеназа. Б. Высокопотенциальные. IV — цитохром *o*; V — цитохром *d*; VI — нитратредуктаза. ФР — фумаратредуктаза. Стехиометрия переноса протонов не определена.

цитохрома типа *c*. Те бактерии, которые, как *E. coli*, не способны синтезировать цитохром *c*, переносят меньшее число протонов на участке цепи от хинонов до O_2 (рис. 5.19).

Протонпереносящие участки дыхательной цепи *E. coli* можно разделить на низко- и высокопотенциальные. В низкопотенциальных участках (рис. 5.19) происходит перенос электронов от таких пар, как $NAD^+/NADH$, $2H^+/H_2$ или $HSCOO^-/CO_2$, на менахинон ($E'_m = -74$ мВ) в анаэробных условиях или на убихинон (UQ_8 в отличие от митохондриального UQ_{10}) как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Бактериальная $NADH$ -дегидрогеназа содержит FMN и Fe/S-центры, так же как и соответствующий митохондриальный фермент. Гидрогеназа тоже является Fe/S-белком. Расположение ее активного центра неизвестно, однако если он лежит вблизи от наружной поверхности мембраны, то, возможно, фермент работает по механизму Лундегардта (рис. 1.14). Формиатдегидрогеназа содержит молибден, Fe/S-центры и гем. Все перечисленные дегидрогеназы транспортируют протоны.

Менахинон, восстановленный в анаэробных условиях, можно вновь окислить с помощью фумарата. Эта реакция, катализируемая фумаратредуктазой, является в сущности сукцинатдегидрогеназной реакцией, протекающей в противоположном направлении, причем у *E. coli* прямую и обратную реакции катализируют различные ферменты. Оба фермента в качестве простетической группы содержат FAD.

Донором электронов для высокопотенциальных участков дыхательной цепи *E. coli* служит UQH_2 , который в свою очередь восстанавливается низкопотенциальными комплексами или такими донорами электронов, как D-лактат или сукцинат. В условиях высокого давления кислорода электроны переносятся через цитохром b_{556} к цитохрому *o*, который является аутооксидабельным цитохромом типа *b*. Когда концентрация O_2 ограничена, включается перенос электронов через цитохром b_{558} на цитохром *d* (содержащий частично насыщенное хлориновое кольцо вместо порфиринового). В условиях строгого анаэробизма и в присутствии NO_3^- синтезируется нитратредуктаза, которая является молибденсодержащим Fe/S-белком, ассоциированным со специфическим цитохромом b_{556} (рис. 5.19). На всех этих участках цепи также транспортируются протоны.

Хемолитотрофные бактерии используют неорганические доноры электронов и способны расти на средах, содержащих лишь минеральные соли, CO_2 и источник азота. Конечным акцептором электронов обычно служит O_2 и в некоторых случаях NO_3^- . Потенциалы полувосстановления электрондонорных пар субстратов этих бактерий очень высоки, и восстановление NAD^+ в них происходит за счет обратного переноса электронов (разд. 4.7). Осо-

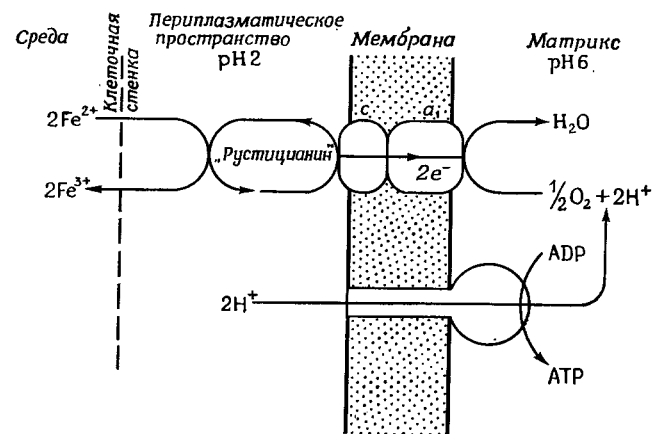
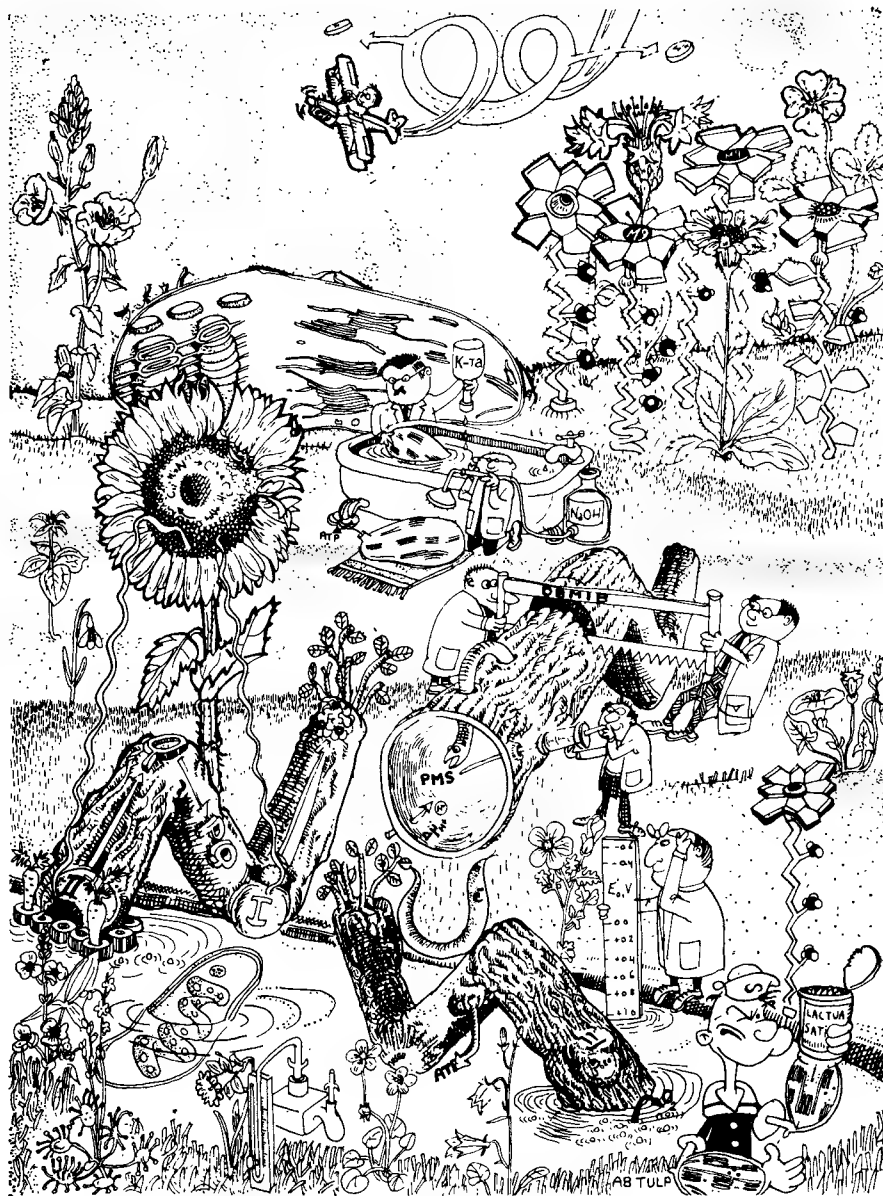


Рис. 5.20. Окислительное фосфорилирование у хемолитотрофной бактерии *Thiobacillus ferrooxidans*, которая растет при pH 2, используя окисление Fe^{2+} с помощью H_2O как единственный источник энергии для роста и фиксации CO_2 (Ingledew et al., 1977). Пара Fe^{2+}/Fe^{3+} имеет $E_m = +780$ мВ.

бый случай — это бактерии *Thiobacillus ferrooxidans*, которые используют в качестве донора электронов пару Fe^{3+}/Fe^{2+} при pH 2 ($E_m = +780$ мВ). Перенос электронов на O_2 в этих бактериях, возможно, служит еще одним примером механизма Лундегардта (разд. 1.4; рис. 5.20).

Образование АТФ в фотосинтетических сопрягающих мембранах происходит при работе протонного цикла, который имеет много общего с уже описанным для митохондрий. В обоих случаях на непроницаемой для протонов мембране образуется $\Delta\mu_{\text{H}^+} \sim 200$ мВ, который затем используется для синтеза АТФ протонпереносящей АТФ-синтетазой. Последняя практически идентична митохондриальному ферменту, за исключением некоторых деталей (разд. 7.2). Разница между системами состоит, конечно, в разной природе первичного источника $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, однако и здесь имеется ряд общих компонентов, таких, как цитохромы, хиноны и Fe/S-центры.

Фотосинтетические системы имеют два уникальных устройства: комплекс антенны, поглощающий фотоны, и реакционный центр (РЦ), куда затем направляется поток энергии. Реакционные центры присоединяют электроны при положительном редокс-потенциале, а затем после поглощения фотона переходят в возбужденное состояние и освобождают электроны с потенциалом на 1 В более отрицательным. Таким образом, энергия света прямо превращается в энергию редокс-потенциала (рис. 6.1). В случае фотосинтезирующих бактерий этот энергизованный электрон поступает в электронтранспортную цепь, которая возвращает его в РЦ. Разность редокс-потенциалов используется в таком цикле для переноса протонов. В хлоропластах циклический перенос электронов превращается в нециклический. Электроны, получаемые при расщеплении воды через РЦ, электронтранспортную цепь и второй РЦ, переносятся на NADP^+ , который имеет редокс-потенциал на 1,1 В более отрицательный, чем пара $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (рис. 6.1). В хлоропластах происходит не только перенос электронов против градиента редокс-потенциала, но и генерация $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, которая обеспечивает синтез АТР. АТР и NADPH используются затем в цикле Кальвина — темновых реакциях фотосинтеза, в которых фиксируется CO_2 .



Хлоропласты шпината погружают в кислотную ванну (рис. 4.19), чтобы синтезировать АТФ в темноте, а в это время «Z»-схема нециклического переноса электронов генерирует кислород и переносит электроны к отрицательному E_0 .

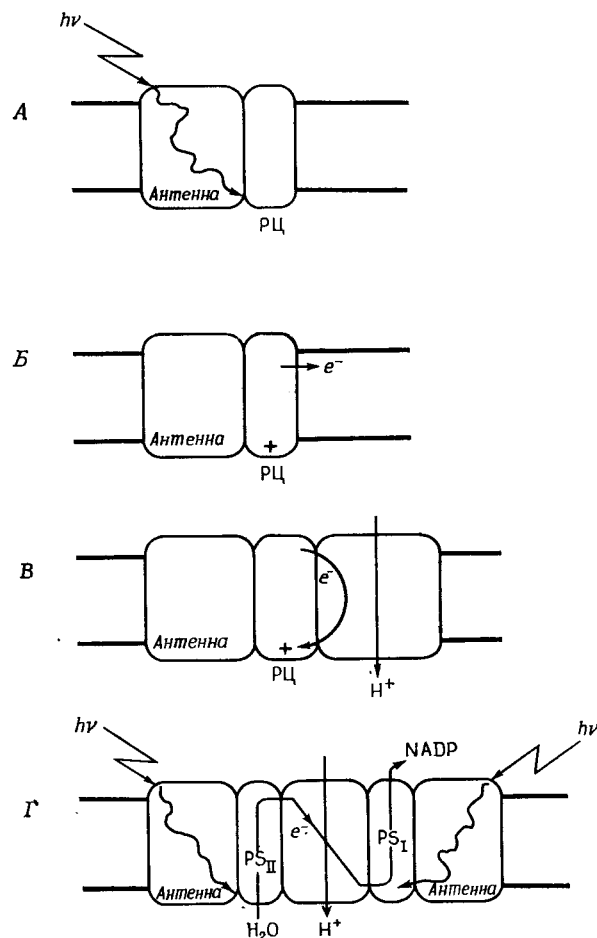


Рис. 6.1. Перенос электронов при фотосинтезе. А. Антенна поглощает фотоны и передает энергию возбуждения на реакционный центр (РЦ). Б. РЦ подает в цепь электроны с отрицательным потенциалом. В. В бактериях электроны возвращаются на РЦ через протонпереносящий комплекс, сходный с комплексом III митохондрий (разд. 5.8). Г. В хлоропластах перенос электронов нециклический. Электроны отщепляются от воды в одном реакционном центре (PS_{II}) и переносятся по протонпереносящей электронтранспортной цепи на другой реакционный центр (PS_I) и затем на $NADP^+$.

6.2. СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ В ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЯХ

(Обзоры: Parson, Cogdell, 1975; Blankenship, Parson, 1978; Prince, Dutton, 1978)

Сильно пигментированные мембраны фотосинтезирующих организмов работают как антенны, поглощая свет и направляя его энергию к специальным РЦ. При взаимодействии РЦ с фотоном его потенциал полувосстановления резко понижается. В результате электрон может быть перенесен на акцептор, который имеет потенциал на 1 В более отрицательный, чем исходный потенциал РЦ. Энергия фотона с длиной волны 870 нм эквивалентна 1,42 эВ (разд. 3.7), так что процесс превращения энергии происходит с высокой эффективностью.

На каждый РЦ может приходиться от 30 до 3000 молекул хлорофилла в антенне, поэтому исследование спектральных изменений в РЦ на фоне поглощения пигментов антенны сильно затруднено. Трудности удается преодолеть благодаря тому, что в выделенных и очищенных от антенн РЦ способны протекать первичные световые реакции. Активные РЦ были выделены из хроматофоров различных пурпурных бактерий (Gingras, 1978). Для этого мембраны растворяли в детергенте, а затем использовали общепринятые методы очистки белков.

Хотя РЦ из разных пурпурных бактерий различаются в деталях, все они обычно имеют мол. массу ~ 75000 , состоят из двух или трех полипептидов и содержат 4 молекулы бактериохлорофилла (БХ), 2 молекулы бактериофеофитина (БФ), 1 атом Fe и одну или две молекулы убинона.

Первичный фотохимический процесс в РЦ приводит к изменению E_m димера молекул БХ (димер обычно обозначают как «Р» с указанием основного максимума поглощения, например R_{870}). $E_{m,7}$ для невозбужденного состояния Р составляет +470 мВ и резко падает, когда димер поглощает квант света и переходит в возбужденное состояние (R^*). Превращение Р в R^* происходит менее чем за 10^{-15} с и связано с переходом электронов на более высокие энергетические уровни. Это в свою очередь приводит к облегчению отрыва электронов от R^* , т. е. к сдвигу E_m в отрицательную область. После отрыва электрона R^* превращается в R^+ , где неспаренный электрон делокализован между двумя молекулами БХ (рис. 6.2).

Первичным акцептором электронов служит молекула бактериофеофитина «I». Она является производной молекулы хлорофилла, в которой атом Mg^{2+} заменен на два протона. Перенос электрона между R^* и I происходит быстрее чем за 10 пс, и в результате образуется бирадикал $(B\dot{X})_2^+ \dots (B\dot{F})^-$ (обозначаемый R^F), имеющий характерный спектр. Исследования выделенного БФ в гидрофобных растворителях показали, что в РЦ он

6.3. ГЕНЕРАЦИЯ $\Delta\mu_{H^+}$ В ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЯХ

(Обзоры: Gromet-Elhanan, 1977; Jones O. T. G., 1977; Dutton, Prince, 1978; Wraight et al., 1978)

Каротиноиды представляют собой очень гетерогенный класс пигментов, имеющих длинные, в основном алифатические, боковые цепи. В этот класс входит около 350 соединений, которые встречаются как в хлоропластах, так и в фотосинтезирующих бактериях. Общей особенностью молекул этих соединений является центральный гидрофобный участок, имеющий систему сопряженных двойных связей, которая несет делокализованные электроны и определяет характерный спектр каротиноидов в видимой области. В экспериментах часто используют тот факт, что при образовании сильного электрического поля на сопрягающей мембране спектр поглощения каротиноидов сдвигается на несколько нанометров (рис. 6.4). Здесь следует напомнить, что мембранный потенциал всего в 100 мВ на мембране толщиной в 10 нм соответствует полю в мембране со средней напряженностью $10^5 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$. Спектральный сдвиг характерен не только для каротиноидов, но в несколько меньшей степени и для хлорофилла. Электрохромные эффекты наблюдаются как в бактериях, так и в хлоропластах, где они были впервые описаны (Junge, Witt, 1968).

Чрезвычайно быстрый ответ каротиноидов на освещение фотосинтетических мембран (менее чем через 20 нс) указывает на то, что они регистрируют какие-то первичные процессы переноса заряда в мембране, хотя сами и не участвуют в процессах фотосинтеза. Начальная фаза ответа каротиноидов коррелирует, по-видимому, с переносом электронов от P^* на X . Это указывает на возможную электрогенность первичных реакций фотосинтеза, т. е. на сопряженный с ними перенос заряда через мембра-

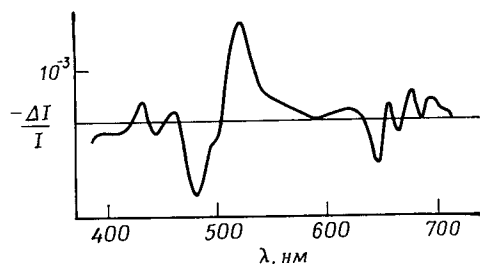


Рис. 6.4. Индуцированные светом электрохромные изменения поглощения в хлоропластах (Junge, 1977). На графике показан дифференциальный спектр (разд. 5.2), возникающий благодаря индуцированному светом красному сдвигу спектра поглощения пигментов. Большой пик при 518 нм обусловлен в основном каротиноидами и обозначается как «сдвиг спектра каротиноидов».

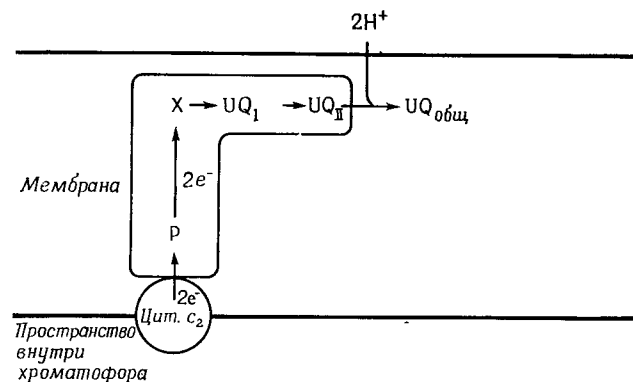


Рис. 6.5. Организация бактериального РЦ в мембране.

ну. В то же время следует помнить, что каротиноиды реагируют на локальное поле в мембране, которое может не совпадать с полем, создаваемым разностью потенциалов между водными фазами по обе стороны мембраны (разд. 3.6). В темноте также можно вызвать сдвиг спектра каротиноидов в том же направлении, что и на свету, если создать диффузионный потенциал K^+ в присутствии валиномицина так, чтобы внутреннее пространство хроматофоров было заряжено положительно.

Большая часть экспериментальных данных указывает на то, что РЦ пересекают всю толщину мембраны (рис. 6.5). Непосредственный донор электронов для P — цитохром c_2 — расположен на внутренней поверхности мембраны хроматофоров, которая соответствует периплазматической поверхности мембраны интактных бактерий (разд. 1.4). Его можно отделить от клеток после разрушения клеточной стенки. В то же время при восстановлении UQ_{II} (разд. 6.2) в препаратах хроматофоров (рис. 6.5) протоны присоединяются из внешней среды.

Помимо переноса электронов от P на X сдвиг спектра каротиноидов позволяет различить еще два электрогенных процесса. Один из них коррелирует с переносом электронов от цитохрома c_2 на P , а другой связан с процессами, сопровождающими перенос электронов от UQ_I на цитохром c_2 (см. ниже).

После одиночной вспышки света сдвиг спектра каротиноидов исчезает со скоростью, которая коррелирует со скоростью рассеивания градиента протонов, причем она может резко возрастать при добавлении протонофора. Таким образом, несмотря на то что каротиноиды реагируют на локальные поля в мембране, измерения спектрального сдвига позволяют следить также за спадом трансмембранной разности потенциалов между водными фазами.

Путь переноса электронов из общего пула убихинонов до цитохрома c_2 полностью не выяснен. В случае *Rps. sphaeroides* удается идентифицировать 3 Fe/S-белка, а также 2 или 3 цитохрома типа b , различающиеся по величине $E_{m,7}$ (−90 мВ, +50 мВ, +15 мВ соответственно). Для выяснения механизма переноса существенны следующие два наблюдения. Во-первых, в присутствии валиномицина (препятствующего образованию $\Delta\psi$) стехиометрия переноса протонов в хроматофорах составляет $2H^+/e^-$, если свет подается последовательными вспышками, каждая из которых индуцирует один цикл переноса электронов. Во-вторых, анализ сдвига спектра каротиноидов в ответ на одну такую вспышку указывает на существование третьей медленной электрогенной стадии. Чувствительность этого процесса к ингибиторам по аналогии с митохондриями (разд. 5.8) свидетельствует об участии в нем цитохромов типа b . Приведенные

данные не согласуются с простейшим предположением о том, что циклический перенос электронов завершается благодаря диффузии UQH_2 через мембрану и прямому восстановлению цитохрома c_2 , при котором протоны освобождаются внутрь хроматофора. Такой механизм должен приводить к стехиометрии $H^+/e^- = 1$ и не должен включать медленной электрогенной стадии. Кроме того, он был бы не эффективен: разность редокс-потенциалов между UQ и цитохромом c_2 соответствует второму «пункту сопряжения» трансмембранного переноса протонов.

Редокс-переносчики циклического пути очень сходны с компонентами протонтранспортного комплекса III в митохондриях (разд. 5.8). Как и в случае митондрий, здесь отсутствует переносчик H-атомов, необходимый для транспорта протонов по механизму петли. Можно предполагать, что циклический перенос электронов включает механизм Q-цикла,

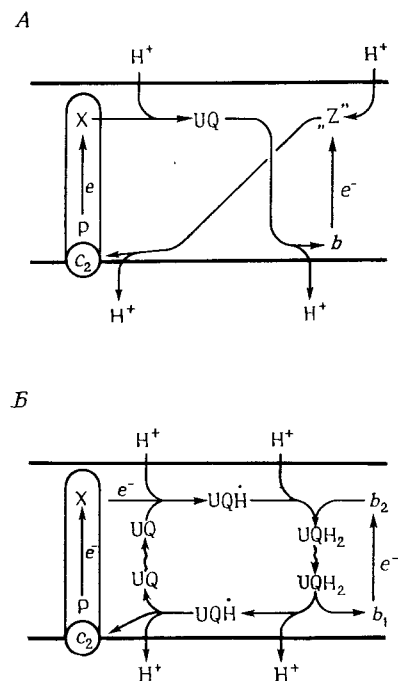


Рис. 6.6. Возможные пути переноса электронов, сопряженного с транспортом протонов в пурпурных бактериях. А. «Двухпетельная» схема, включающая переносчик атомов водорода ($H^+ + e^-$) (Wright et al., 1978). Б. Схема Q-цикла (Dutton, Prince, 1978).

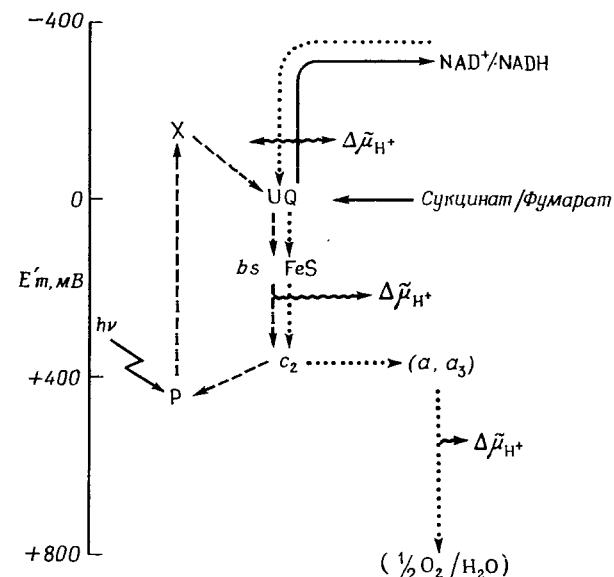


Рис. 6.7. Пути переноса электронов в *Rps. sphaeroides*. Штриховые стрелки показывают поток электронов при циклическом пути переноса. Сплошные стрелки показывают $\Delta\mu_{H^+}$ -зависимый перенос электронов от сукцината на NAD^+ . Пунктирные стрелки соответствуют аэробной дыхательной цепи после индукции терминальной оксидазы. Показана упрощенная схема; в ней не рассмотрены стадии переноса электронов в районе цитохромов b .

где восстановление пула UQ происходит в две стадии с образованием семихинона (рис. 6.6). Следует отметить, однако, что ни одна из существующих моделей (две из них показаны на рис. 6.6) не может объяснить все имеющиеся данные, и истинный механизм пока еще не установлен.

Циклический перенос электронов приводит к генерации $\Delta\mu_{H^+}$, но не вызывает образования восстановительных эквивалентов, таких, как NADH или NADPH, необходимых для биосинтезов. В пурпурных серных бактериях донорами электронов для восстановления нуклеотидов служат H_2S или $S_2O_3^{2-}$, а в несерных пурпурных бактериях — малат и сукцинат. Поскольку редокс-потенциалы компонентов цепи циклического переноса электронов выше, чем у пары $NAD(P)^+/NAD(P)H$, прямого восстановления никотинамидных нуклеотидов, как в случае хлоропластов (разд. 6.4), не происходит. Оно идет за счет $\Delta\mu_{H^+}$ -зависимого обратного переноса электронов (разд. 4.7, рис. 6.7).

Большинство видов бактерий группы *Rhodospirillaceae* могут расти в аэробных условиях в темноте. Кислород подавляет синтез БХ и каротиноидов, так что РЦ в таких клетках не об-

разуются. В то же время сохраняются цитохромы *b* и *c* и индуцируется синтез терминальной оксидазы, которая в случае *Rps. sphaeroides* представляет собой Cu-содержащий белок, очень сходный с митохондриальным комплексом IV (разд. 5.9). Таким образом, в бактериях возникает полная дыхательная цепь, состоящая из предсуществовавших цитохромов, индуцированной оксидазы и пути обратного переноса электронов от хинонов на NAD(P)H (рис. 6.7). Становится также понятен биологический смысл сходства между редокс-переносчиками фотосинтетической электротранспортной цепи и митохондриальным комплексом III. Циклический фотосинтетический перенос электронов можно реконструировать в аэробно выращенных клетках, если добавить к ним *in vitro* РЦ и комплексы антенн.

6.4. ПУТЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ

(Обзоры: Hill, 1965; Trebst, 1976; Crofts, Wood, 1977; Hauska, Trebst, 1977; Junge, 1977; Blankenship, Parsons, 1978; Witt, 1979)

Фотосинтетический перенос электронов в хлоропластах отличается от бактериального двумя следующими признаками: 1) первый процесс не является циклическим и приводит к стехиометрическому окислению H_2O и восстановлению $NADP^+$; 2) в нем последовательно протекают две светозависимые реакции, что позволяет перекрыть перепад редокс-потенциала между парами $H_2O/\frac{1}{2}O_2$ и $NADP^+/NADPH$ (рис. 6.1).

Присутствие двух различных РЦ в одной мембране затрудняет их выделение и очистку. Всю информацию в этом случае приходится добывать при исследовании интактных мембран тилакоидов, где в фотореакциях участвует лишь менее 1% пигментов, а остальные выполняют функции антенн (Bennett, 1979). Отсюда следует, что эксперименты с тилакоидами требуют очень чувствительных методов измерения.

Перенос электронов в хлоропластах в общих чертах представлен на рис. 6.8. Первичный донор электронов в фотосистеме I, обозначаемый как P_{700} , представляет собой димер хлорофилла *a* и имеет много общего с бактериальным P_{370} . Потенциал полувосстановления невозбужденной формы P_{700} составляет $\sim +450$ мВ. При возбуждении потенциал сдвигается в отрицательную область (рис. 6.9) и комплекс испускает электрон. Сдвиг спектра каротиноидов (разд. 6.3), который был впервые зарегистрирован именно в хлоропластах, указывает на то, что электрон переносится через мембрану быстрее чем за 20 нс. Природа первичного акцептора электронов в фотосистеме I не ясна, однако установлено, что связанный ферредоксин с $E_{m,7}$ около -570 мВ восстанавливается очень быстро. Перенос элект-

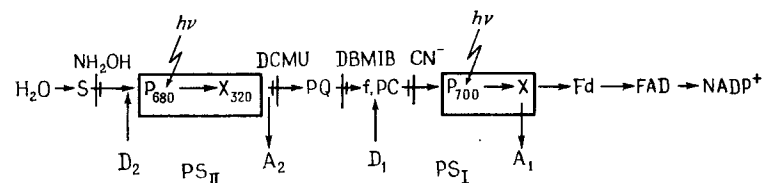


Рис. 6.8. Линейная последовательность переноса электронов в хлоропластах (Hauska, Trebst, 1977). Ингибиторы переноса электронов: NH_2OH , DCMU (N-дихлорфенил-N'-диметилмочевина), DBMIB (дибромметилнпропил-*n*-бензохинон) и CN^- действуют в пунктах, указанных на схеме. D_2 — доноры электронов для фотосистемы II (например, бензидин, катехол). A_2 — акцепторы электронов для фотосистемы II [например, феррицианид, кремниймоллибдат, фенилендиамин, бензохиноны, DAD (диаминодурен)]. D_1 — доноры для фотосистемы I, например восстановленный фенилендиамин, DPIPH₂ (восстановленный 2,6-дихлорфенолндофенол). A_1 — акцепторы для фотосистемы I, например феррицианид, $NADP^+$, MV (метилвиологен), AQ (антрахинон-2-сульфонат).

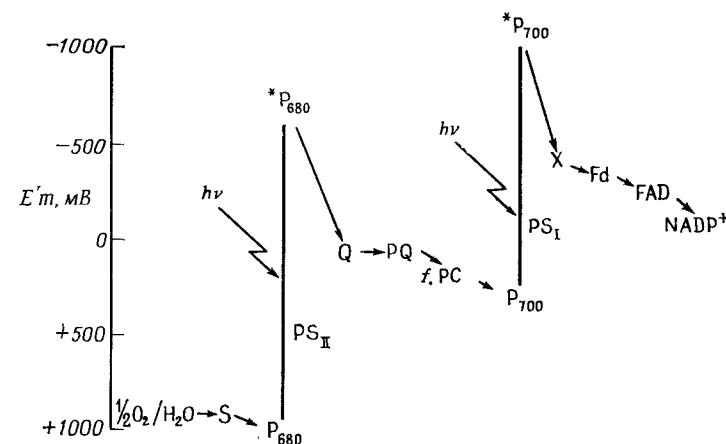


Рис. 6.9. Перенос электронов в хлоропластах и редокс-потенциалы переносчиков.

ронов на $NADP^+$ завершается ферредоксин — $NADP^+$ -редуктазой.

Ревосстановление первичного донора P_{700}^+ происходит в течение 200 мкс при участии пластоцианина (PC) — Cu-содержащего белка, который работает как двухэлектронный переносчик и имеет E_m около $+370$ мВ. В литературе имеются данные об участии в этом процессе цитохрома *f* — правда, они довольно противоречивы.

Фотосистема II обладает замечательной способностью окислять H_2O (для пары $H_2O/\frac{1}{2}O_2$ $E_{m,7} = +820$ мВ). Первичным до-

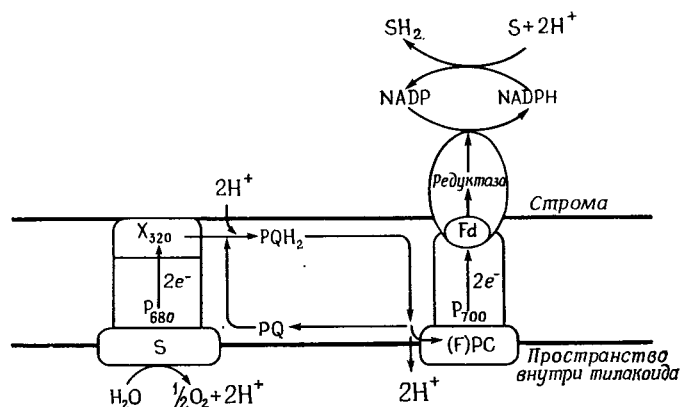


Рис. 6.10. Расположение переносчиков электронов в мембране хлоропластов (Witt, 1979).

норм электронов, который обозначают как P_{680} , по-видимому, является хлорофилл a . Как и в случае фотосистемы I, электрическое поле на мембране возникает менее чем за 20 нс. Первичным акцептором электронов служит пластохинон X_{320} , который напоминает UQ_1 в бактериальной системе и может находиться в двух состояниях: полностью окисленном и в виде аниона семихинона (PQ^-). Как и в случае бактериальных РЦ, в цепь включена, по-видимому, и вторая молекула связанного PQ , которая работает как двухэлектронный преобразователь при переносе электронов в суммарный пул хинонов. Никаких интермедиатов между P_{680} и X_{320} пока не обнаружено.

Основным донором электронов для фотосистемы II является H_2O . Предполагается, что специальная ферментная система, обозначаемая через «S», отдает P_{680} четыре электрона, а затем окисляет $2H_2O$ до $O_2 + 2H^+ + 4e^-$. Связь между фотосистемой II и пластоцианином, который восстанавливает фотосистему I, осуществляется через суммарный пул PQ . Пул пластохинонов является как бы «электронным буфером» между фотосистемами и, возможно, играет роль Н-ветви в митчелловской петле, обеспечивая перенос $2H^+ + 2e^-$ во внутреннее пространство тилакоидов (рис. 6.10).

Предполагается, что функции хинонов в хлоропластах, как и в случае митохондриального комплекса III (разд. 5.8), в пурпурных бактериях (разд. 6.3) еще более сложны (Hauka, Trebst, 1977). Возможно, они вместе с цитохромами типа b образуют цикл, аналогичный Q-циклу в митохондриях (разд. 5.8).

Сдвиг спектра каротиноидов указывает на то, что обе фотосистемы ориентированы поперек мембраны тилакоидов. В ответ на освещение тилакоиды способны накапливать липофиль-

ные анионы (разд. 2.5.4). Следовательно, при работе фотосинтетической цепи переноса электронов пространство внутри тилакоидов заряжается положительно. Важные данные об ориентации фотосистемы II были получены в экспериментах, где наблюдали за выходом протонов, образующихся при расщеплении H_2O . Оказалось, что они обнаруживаются во внешней среде только после добавления протонифора, и, следовательно, восстановление воды происходит на внутренней стороне мембраны тилакоидов. X_{320} должен быть расположен вблизи от наружной поверхности мембраны, так как мягкая обработка трипсином делает его доступным для непроникающих акцепторов электронов, таких, как феррицианид. Ферредоксин— $NADP^+$ -редуктаза доступны для добавленных антител. Этот факт указывает на то, что фотосистема I ориентирована аналогично фотосистеме II (рис. 6.10).

Хотя природный путь переноса электронов в хлоропластах не является циклическим, в них можно искусственно индуцировать циклический перенос, если добавить вещества типа феназинметосульфата (PMS), которые могут служить как донорами, так и акцепторами электронов в фотосистеме I. Эти вещества восстанавливаются на наружной стороне мембраны, затем диффундируют через мембрану и вновь отдают электроны фотосистеме I на внутренней стороне. Если такой реагент является переносчиком Н-атома, то может возникнуть искусственная петля, заряжающая мембрану и способная поддерживать циклическое фотофосфорилирование (рис. 6.11).

6.5. ПРОТОННЫЙ ЦИКЛ В ХЛОРОПЛАСТАХ

(Обзоры: Jagendorf, 1975; Trebst, 1976; Avron, 1977, 1978; Hauka, Trebst, 1977; Reeves, Hall, 1978).

Ориентация электротранспортной цепи и АТФ-синтазы (разд. 1.3) в хлоропластах указывает на то, что протонный цикл в них работает в направлении, противоположном тому, которое характерно для интактных митохондрий. Хлоропласты с разрушенной наружной оболочкой способны при освещении поглощать протоны. Образующийся при световых реакциях на мембране тилакоидов $\Delta\psi$ затем в течение секунд превращается в

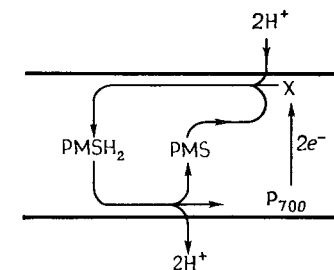


Рис. 6.11. Искусственный циклический перенос электронов в хлоропластах, сопряженный с транспортом протонов. PMS, $PMSH_2$ — соответственно окисленная и восстановленная формы N-метилфеназинметосульфата.

ΔpH в результате перераспределения ионов Mg^{2+} (в интактных хлоропластах) или Cl^- (в разрушенных; рис. 4.8). Измерение накопления радиоактивных аминов или тушения флуоресценции 9-аминоакридина показывает, что в стационарном состоянии ΔpH может превышать 3 единицы. Рассеивание промежуточного $\Delta\psi$ происходит настолько быстро, что его удается измерить лишь по сдвигу спектра каротиноидов, но не по перераспределению меченых анионов.

За начальными потоками протонов после включения света можно следить спектрофотометрически с помощью pH-индикаторов, таких, как нейтральный красный. Хотя перенос электронов от фотосистемы II на PQ происходит за 2 мс, константа скорости поглощения протонов из среды составляет ~ 60 мс. Это указывает на то, что на наружной поверхности мембраны тилакоидов существует диффузионный барьер для протонов.

Как и в случае митохондрий, при определении стехиометрии $H^+/2e^-$ для хлоропластов возникают значительные трудности. В литературе нет согласия относительно этой величины. Так называемая «Z-схема» (рис. 6.1 и 6.10) предсказывает, что при переносе каждых $2e^-$ внутри тилакоидов образуется $2H^+$ благодаря фотолизу воды и $2H^+$ поглощаются из внешней среды при образовании PQH_2 . Стехиометрия протонов и электронов при работе фотосистемы I зависит от природы конечного акцептора электронов. В том случае, если акцептируются $2H$ -атома, из среды поглощаются $2H^+$ (рис. 6.10), а при стехиометрическом восстановлении природного акцептора — $NADP^+$ (который присоединяет $1H^+ + 2e^-$) поглощается лишь один H^+ . Если же использовать чисто электронный акцептор, например феррицианид, то протоны вообще не поглощаются. Во всех этих случаях внутри тилакоида выделяется $2H^+$ благодаря реокислению PQH_2 (рис. 6.10).

АТФ-синтаза в хлоропластах (разд. 7.2) сходна с аналогичным митохондриальным ферментом. Если латентный фермент активировать, создав на мембране $\Delta\mu_{H^+}$ (разд. 7.2), то затем в темноте можно наблюдать АТФ-зависимый транспорт H^+ внутрь тилакоидов. Как и для других АТФ-синтаз, данные о стехиометрии H^+/ATP в случае хлоропластов противоречивы и пока не позволяют сделать выбор между величинами 2 и 3 (Hauka, Trebst, 1977).

6.6. БАКТЕРИОРОДОПСИН И ПУРПУРНЫЕ МЕМБРАНЫ ГАЛОБАКТЕРИЙ

(Обзоры: Henderson, Unwin, 1975; Stockenius, 1976; Stockenius, 1979; Eisenbach, Caplan, 1977, 1979)

Галобактерии являются экстремальными галофилами. Они живут в основном в соленых озерах, так как для их роста необходимы очень высокие концентрации $NaCl$ и солей Mg^{2+} . Наиболее изученный вид галофильных бактерий — *Halobacterium halobium*. При росте в аэробных условиях эти бактерии имеют обычную дыхательную цепь, однако, если рост происходит на свету и при пониженной концентрации кислорода, они начинают синтезировать на мембране пурпурные бляшки. Последние можно выделить, уменьшая осмолярность среды, поскольку при этом они сохраняют свою интактную структуру, тогда как остальная мембрана полностью разрушается. Бляшки состоят из плоских слоев, образованных одним белком — бактериородопсином, который упакован в виде гексагональной кристаллической структуры. Этот белок составляет около 75% сухого веса мембраны, остальные 25% приходятся на фосфолипиды. Белок состоит из одного полипептида с мол. массой 26 000. Его окраска обусловлена молекулой ретиналя, который через шиффово основание ковалентно связан с остатком лизина (рис. 6.12). Упорядоченное двумерное расположение бактериородопсина в пурпурных мембранах позволяет провести очень точную реконструкцию его структуры по электронным микрофотографиям. С разрешением в 7 Å было установлено, что он образует кристаллическую структуру 3D-типа (Unwin, Henderson, 1975; Henderson, Unwin,

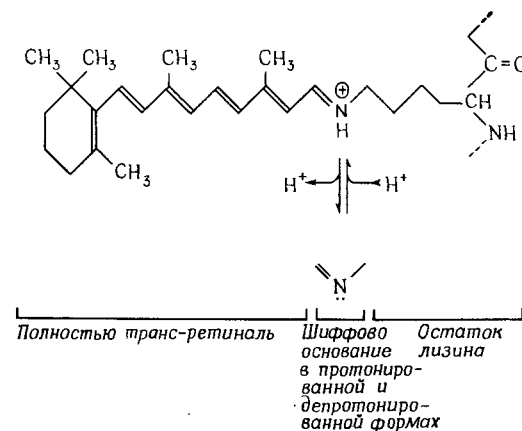


Рис. 6.12. Хромофор бактериородопсина — ретиналь.



Рис. 6.13. Модель молекулы бактериородопсина при рассмотрении в плоскости, перпендикулярной плоскости мембраны (Henderson, Unwin, 1975).

1975). Белок содержит 7 α -спиральных участков, каждый из которых пересекает мембрану (рис. 6.13).

Клетки *H. halobium* способны использовать энергию света для выброса протонов и синтеза АТФ, несмотря на то что в них отсутствует хлорофилл. Было установлено, что перенос протонов происходит при работе бактериородопсина. Для этого выделенные пурпурные мембраны были реконструированы в замкнутые мембранные везикулы с помощью добавленных фосфолипидов. Такие везикулы имеют ориентацию мембраны, противоположную

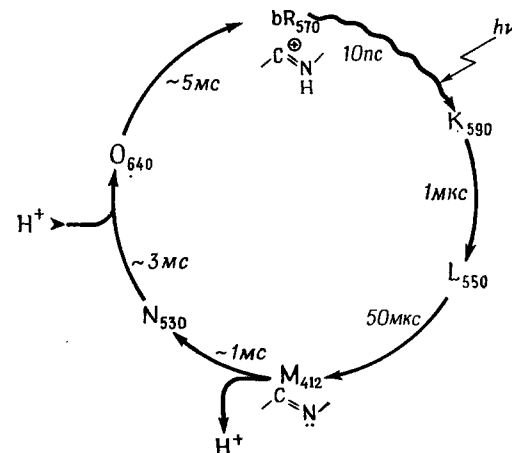


Рис. 6.14. Фотохимический цикл бактериородопсина (Stoekenius et al., 1979).

ориентации мембран intactных клеток, и способны поглощать протоны при освещении. Рэкер и Стокениус (Racker, Stoekenius, 1974) добавили к этим везикулам АТФ-синтетазу из сердца быка и наблюдали светозависимый синтез АТФ. Значение этого эксперимента состоит в том, что его очень трудно объяснить с позиций любой из гипотез «прямого сопряжения». Действительно, бактериородопсин и АТФ-синтетаза из бычьего сердца никогда не «встречались», и очень маловероятно, что они способны к прямому взаимодействию.

Бактериородопсин является простейшей из известных протонных помп. Он отличается от всех прочих светозависимых или дыхательных протонных помп тем, что транспорт H^+ в нем не связан с переносом электронов. Последовательность фотохимических реакций бактериородопсина очень сложна (рис. 6.14) и выяснена еще не до конца. При освещении пигмент выцветает, и при этом происходит векторное освобождение протонов на наружной стороне мембраны. Обесцвеченная форма пигмента, обозначаемая через «М», затем вновь превращается в пурпурную, что сопровождается захватом протона из внутриклеточного пространства. С помощью низкотемпературной и лазерной флуоресцентной спектроскопии удалось различить целый ряд интермедиатов. Единственной группой белка, для которой в настоящее время установлено, что в фотоцикле происходит ее обратимое протонирование и депротонирование, является шиффово основание, связывающее ретиналь с белком (рис. 6.12). Оно протонировано в исходном пигменте и депротонировано в «М-форме».

АТФ-СИНТЕАЗА

7.1. ВВЕДЕНИЕ

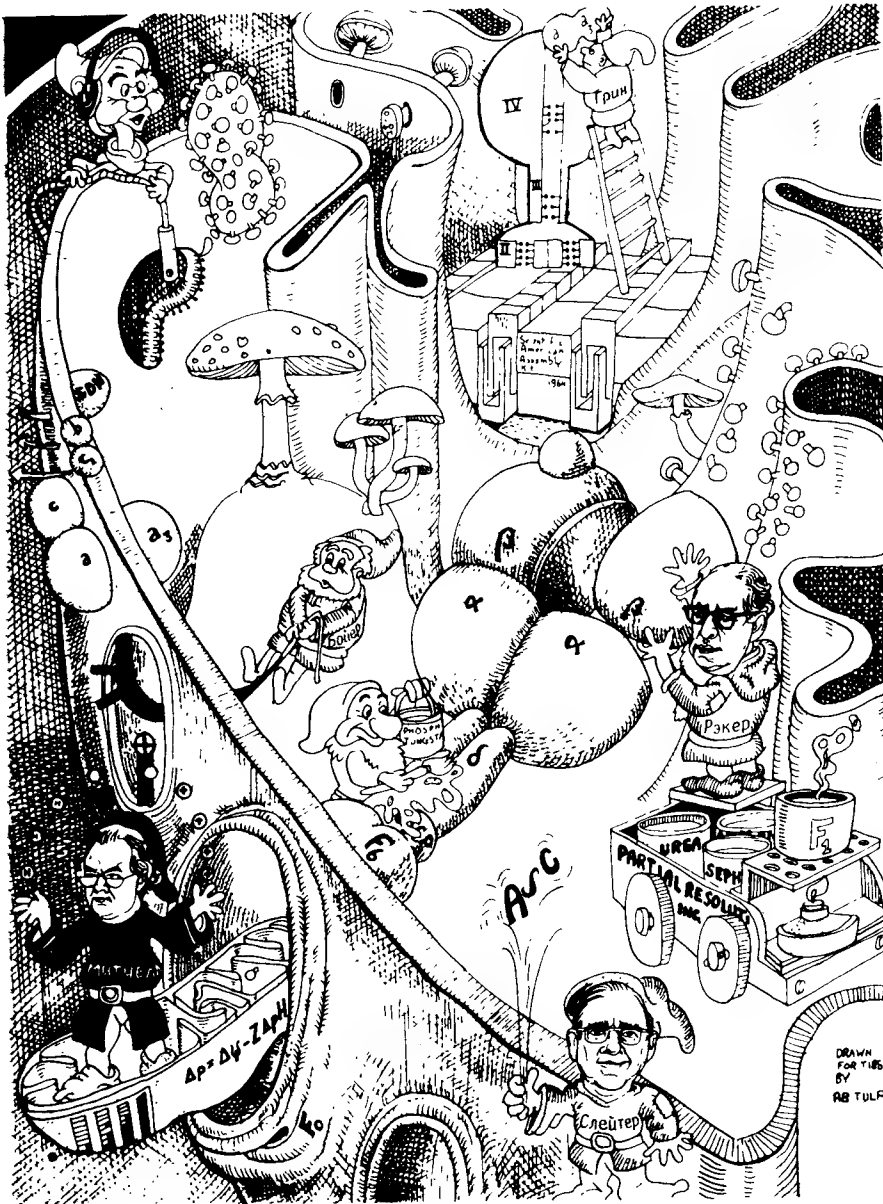
АТФ-синтетаза является универсальным компонентом сопрягающих мембран. Она присутствует в митохондриях, в хлоропластах, в аэробных и фотосинтезирующих организмах и даже в тех бактериях, которые лишены функциональной дыхательной цепи и существуют за счет гликолиза (разд. 4.7). АТФ-синтетазный комплекс имеет сходное строение во всех мембранах и сильно отличается от других АТФ-зависимых ионных помп, таких, как Na^+ , K^+ -АТФазы из плазматической мембраны эукариотических клеток или Ca^{2+} -АТФазы, отвечающая за накопление Ca^{2+} в цистернах саркоплазматического ретикулума. АТФ-синтетаза сопрягающих мембран использует энергию $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ для поддержания концентрации АТФ, отличающейся от равновесной по крайней мере на семь порядков величины. В случае анаэробных бактерий она использует АТФ для поддержания $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, необходимой для транспортных процессов.

7.2. СТРУКТУРА АТФ-СИНТЕАЗЫ

[Обзоры: Senior, 1973; Pedersen, 1975; Racker, 1975, 1976; Penefsky, 1979 (митохондрии); Nelson, 1976; Junge, 1977; Shavit, 1980 (хлоропласты); Kagawa, 1978; Downie et al., 1979 (прокариоты)].

АТФ-синтазу можно увидеть в электронный микроскоп в препаратах сопрягающих мембран после негативного контрастирования с помощью фосфовольфрамата. Комплексы выглядят как шляпки грибов, выступающие на одной стороне мембраны. Ориентация шляпок различна: в бактериях и митохондриях они выступают в матрикс или внутриклеточное пространство; в изолированных тилакоидах, хроматофорах или полученных после обработки ультразвуком субмитохондриальных частицах они располагаются снаружи. В любом случае функциональная и структурная ориентации совпадают: АТФ гидролизуются или синтезируются на той стороне мембраны, где выступают шляпки, а протоны захватываются при синтезе АТФ с той стороны, где шляпок нет (рис. 1.1).

АТФ-синтетазный комплекс состоит из по крайней мере девяти различных полипептидов; некоторые из этих полипептидов представлены в нескольких копиях. Важнейшей проблемой является выяснение функций каждого из полипептидов. Комплекс можно разделить на две части: шляпку, которая видна в электронный микроскоп и является каталитическим компонентом



Пока Митчелл жонглирует протонами и зарядами, Слейтер пытается поймать неуловимый интермедиат, а Бойер создает конформационное напряжение, Рэкер собирает холодолабильную F_1 -АТФазу.

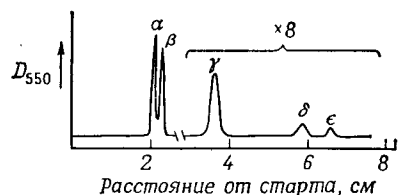


Рис. 7.1. Полипептидный состав митохондриальной F_1 -АТФазы (интенсивность полос γ , δ и ϵ увеличена в 8 раз).

вий, таких, как обработка мочевиной, хелатирующими агентами или уменьшение ионной силы. Изолированный F_1 — это растворимый белок с мол. массой $\sim 360\,000$. Он состоит из 5 (иногда 6) полипептидов (рис. 7.1). Субъединичный состав F_1 из различных источников очень сходен. Обычно мол. масса субъединиц, определенная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН (рис. 7.1), составляет 56 000 (α -субъединица), 53 000 (β -субъединица), 33 000 (γ -субъединица), 16 000 (δ -субъединица) и 11 000 (ϵ -субъединица). Данные о стехиометрии субъединиц достаточно противоречивы, предполагаются варианты $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_1\epsilon_2$ или $\alpha_3\beta_3\gamma_2\delta_1\epsilon_2$.

После отделения F_1 от мембраны его свойства изменяются. Так, например, изолированный F_1 обратимо диссоциирует на холоду с потерей каталитической активности [во всех случаях, кроме чрезвычайно стабильного TF_1 из термофильной бактерии PS3 (Kagawa et al., 1979)]. Растворимый F_1 катализирует гидролиз АТФ с очень высокой скоростью. При 25 °C один моль F_1 может гидролизовать около 10^4 молей АТФ в минуту. Вместе с тем обратную реакцию — синтез АТФ на растворимом F_1 — наблюдать не удается. Изолированный F_1 не обладает абсолютной специфичностью к нуклеотидам: он катализирует также гидролиз и ИТР, и ГТР.

F_1 можно расщепить, не нарушив его каталитической активности. Так, после обработки CF_1 трипсином получают комплекс, состоящий лишь из α - и β -субъединиц, но сохраняющий некоторую активность. Фотоаффинные аналоги АТФ, которые ковалентно связываются с белком после освещения ультрафиолетовым светом, оказываются ассоциированными в основном с β -субъединицей (Scheurich et al., 1978). По-видимому, на этой субъединице расположен активный центр фермента. Минорная δ -субъединица, скорее всего, необходима для связывания F_1 с F_0 . Существует природный белковый ингибитор АТФазы, который предотвращает гидролиз АТФ при низких значениях $\Delta\mu_{H^+}$.

комплекса (ее обозначают F_1 в митохондриях, CF_1 в хлоропластах и TF_1 в термофильных бактериях), и остальную часть комплекса, которая состоит из гидрофобных белков, погружена в мембрану и обеспечивает, по-видимому, перенос протонов через мембрану к F_1 . Гидрофобную часть обозначают F_0 . F_1 можно отделить от F_0 и, следовательно, от мембраны с помощью различных воздей-

Активность CF_1 в дезэнергизованной мембране подавлена значительно сильнее, чем в случае митохондриального фермента.

Функции индивидуальных субъединиц АТР-синтетазы *E. coli* были исследованы генетическими методами с помощью *unc*-мутантов, дефектных по синтезу АТФ (Downie et al., 1979; Gibson et al., 1979). Было обнаружено пять генов *unc* от А до Е, которые образуют часть оперона в хромосоме *E. coli*. Оказалось, что гены *unc A* и *unc D* кодируют соответственно α - и β -субъединицы F_1 ; гены *unc B* и *unc E*, по-видимому, кодируют компоненты F_0 .

Изолированный F_1 не может связываться непосредственно с F_0 в отсутствие компонента комплекса, который был назван «белком, сообщаемым чувствительность к олигомицину» или OSCP (мол. масса 18 000). Олигомицин — это антибиотик, продуцируемый актиномицетами *Streptomyces*. Он ингибирует АТР-синтетазу, связываясь с одним из компонентов F_0 (но не с OSCP). Олигомицин блокирует перенос протонов через F_0 (разд. 5.3). В полном комплексе $F_0 \cdot F_1$ это приводит к подавлению как синтеза, так и гидролиза АТФ. Чувствительность к олигомицину может служить хорошим критерием правильного соединения F_0 с F_1 . Олигомицин эффективен лишь в случае митохондриального фермента, что хорошо согласуется с отсутствием OSCP в составе комплекса из хлоропластов и бактерий. В бактериальных и фотосинтетических мембранах аналогично олигомицину действует дициклогексилкарбодимид (ДЦКД), однако точки их действия не совпадают.

Как и в случае других мембранных белков, выделение пептидов, образующих F_0 , является сложной задачей. Эти пептиды очень гидрофобны, и поэтому полный комплекс $F_0 \cdot F_1$ удается солюбилизовать, лишь полностью разрушив мембрану. После такой солюбилизации комплекс можно разделить на F_1 и F_0 .

F_0 из термофильной бактерии PS3 имеет мол. массу 92 000 и состоит из субъединиц трех типов: шести копий ДЦКД-связывающего белка с мол. массой 5400; трех копий TF_1 -связывающего белка (мол. масса 13 000) и одного основного

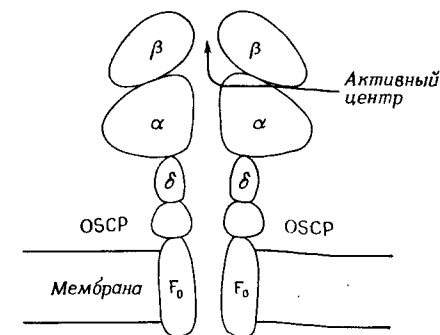


Рис. 7.2. Возможная модель организации субъединиц в комплексе $F_0 \cdot F_1$ (Racker, 1976, с модификациями). Схема является гипотетической; на ней отсутствуют γ - и ϵ -субъединицы, так как их расположение неизвестно. OSCP — белок, сообщаемый чувствительность к олигомицину (от англ. oligomycin sensitivity conferring protein).

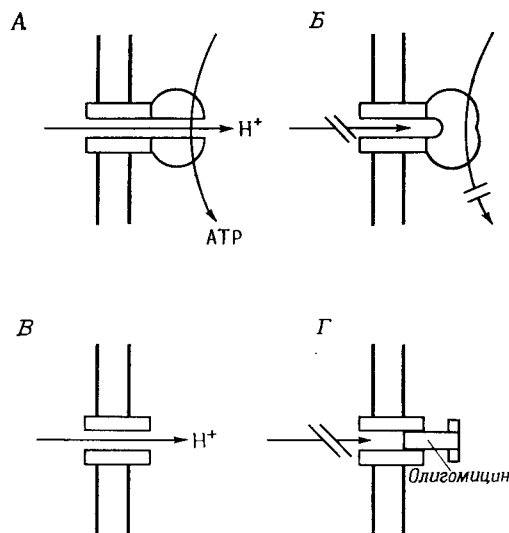


Рис. 7.3. Условия для переноса протонов через мембрану в интактных и лишенных F_1 органеллах. Интактная АТФ-синтетаза проводит протоны только сопряженно с синтезом АТФ (А). Переноса протонов не происходит, если синтез АТФ заблокирован (Б). В мембранах, лишенных F_1 (В), происходит неконтролируемый перенос протонов через АТФ-синтетазу, который чувствителен к ингибиторам, действующим на F_0 , например к олигомицину (Г).

белка, сходного с митохондриальным OSCP (мол. масса 19 000) (Kagawa et al., 1979). Структуру полного комплекса $F_1 \cdot F_0$ можно себе представить так, как это показано на рис. 7.2.

7.3. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ F_0

(Обзоры: Kagawa et al., 1979; Fillingame, 1980)

Если от субмитохондриальных частиц отделить F_1 , что сделать нетрудно, то такие частицы не только не синтезируют и не гидролизуют АТФ, но не способны также катализировать любые энергозависимые процессы. При добавлении олигомицина или связывании F_1 способность к этим реакциям восстанавливается. Эффект отделения F_1 от мембраны оказывается аналогичным действию протонифора. Это указывает на то, что F_0 в АТФ-синтетазном комплексе создает протонную проводимость между внешней средой и активным центром F_1 . В норме перенос протонов сопряжен с синтезом АТФ, однако после отделения F_1 возникает неконтролируемая протонная проводимость, которая не зависит от синтеза АТФ, но по-прежнему блокируется олигомицином или ДЦКД (рис. 7.3.).

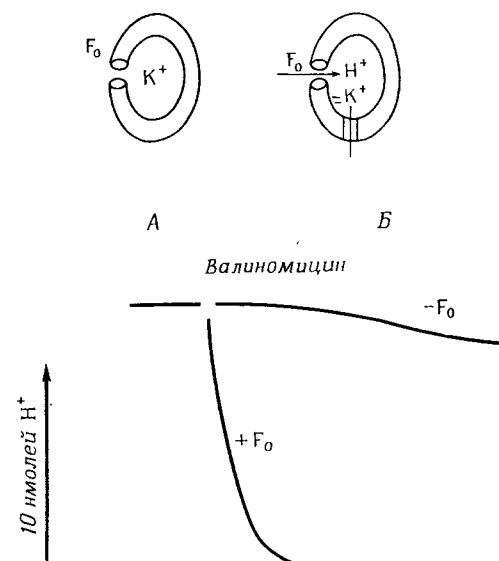


Рис. 7.4. Очистленный F_0 обеспечивает протонную проводимость через искусственный фосфолипидный бислой (Okamoto et al., 1977). Высокоочищенный F_0 из термофильной бактерии PS3 был суспендирован вместе с фосфолипидами из соевых бобов в растворе, содержащем холат и трициновый буфер. Затем холат удаляли диализом в течение 16 ч. При этом образовывались везикулы (разд. 1.3) с F_0 , встроенным в бислой. Везикулы нагружали KCl, инкубируя их при 55°C в среде с KCl. Затем их промывали и суспендировали в среде без KCl в ячейке с pH-электродом (А). После этого добавляли валиномицин, что приводило к образованию диффузионного потенциала за счет выхода K^+ по градиенту концентрации и к поглощению H^+ через F_0 в ответ на образование потенциала (Б). Сам фосфолипидный бислой имеет очень низкую проводимость для протонов, и в отсутствие F_0 наблюдается лишь незначительное поглощение H^+ (В).

Этот вывод был подтвержден опытами, в которых частично очищенный F_0 из митохондрий сердца быка (Kagawa et al., 1973) или хорошо очищенный TF_0 из термофильной бактерии (Okamoto et al., 1977) при встраивании в искусственную мембрану вызывали в ней специфическую протонную проводимость (рис. 7.4).

7.4. МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА АТФ

(Обзоры: Mitchell., 1974b; Boyer et al., 1977; Kozlov, Skulachev, 1977)

Неизвестно, каким образом АТФ-синтетаза использует энергию протонного электрохимического потенциала для сдвига равновесия АТФазной реакции в сторону синтеза АТФ. Этот механизм, по-видимому, отличается от механизма работы других АТФ-зависимых ионных помп, таких, как Na^+ , K^+ -АТРаза плазматической мембраны животных клеток и Ca^{2+} -АТРаза саркоплазматического ретикулума. В отличие от этих систем в системе АТФ-синтеты не существует фосфорилированного промежуточного продукта.

Митчелл (Mitchell, 1974b) предложил гипотетический механизм, в котором протоны прямо участвуют в фосфорилировании ADP в активном центре (рис. 7.5). Согласно этой модели, два протона переносятся за счет энергии $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ через F_0 в активный центр и атакуют один из кислородных атомов в фосфате. В результате образуется вода и очень реакционноспособное производное P_i , которое прямо реагирует с ADP с образованием АТФ.

В альтернативном механизме, предложенном Бойером, Слейтером и др., предполагается не столь прямое участие переносимых протонов в синтезе АТФ. В нем большое значение придается участию полипептидов F_1 в этом процессе. Авторы предполагают, что свободная энергия протонного градиента используется для индукции конформационных изменений в молекуле F_1 (Slater, 1974; Boyer, 1977). Конформационные изменения приводят к синтезу АТФ благодаря тому, что изменяется относительное сродство F_1 к субстратам и продуктам АТФазной реакции. Собственно образование АТФ в активном центре не требует значительных затрат энергии. Основной энергозависимой стадией синтеза АТФ является освобождение свя-

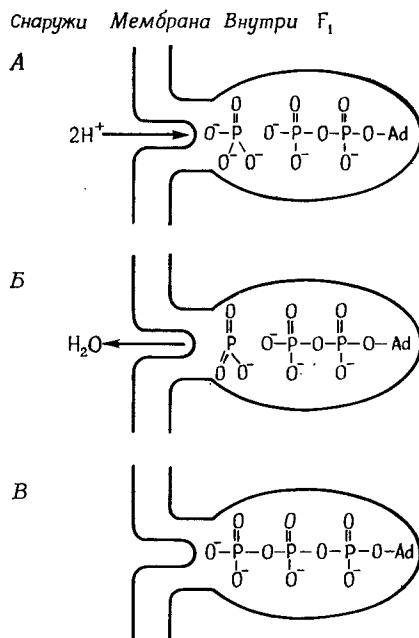


Рис. 7.5. Модель «прямого сопряжения» для синтеза АТФ (Mitchell, 1974b). Ad — аденозин.

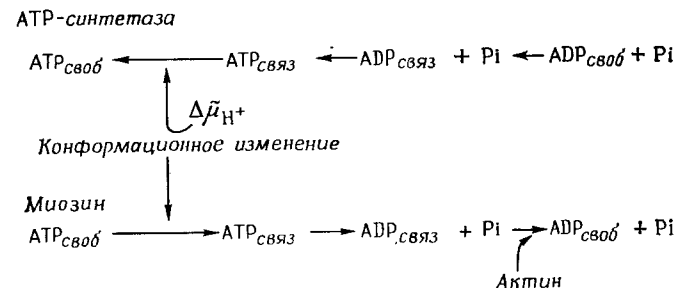


Рис. 7.6. Модель «непрямого сопряжения» для синтеза АТФ имеет много общих черт с механизмом гидролиза АТФ актомиозиновым комплексом в мышцах (Chappell, 1977).

занного АТФ из активного центра F_1 в раствор. Примером сходного механизма может служить гидролиз АТФ миозином при мышечном сокращении (рис. 7.6). В этом случае связывание АТФ сопровождается большим изменением свободной энергии системы и приводит к значительным конформационным изменениям в белке. Гидролиз связанного АТФ сопровождается значительно меньшим изменением свободной энергии (Chappell, 1977).

Ряд экспериментальных данных свидетельствует в пользу этой модели. Во-первых, $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ действительно вызывает конформационные перестройки в хлоропластном CF_1 . Экспериментально (Ryrie, Jagendorf, 1972) показано, что медленное включение атомов ^3H из $^3\text{H}_2\text{O}$ в CF_1 ускоряется при светозависимой генерации $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Это указывает на изменения третичной структуры фермента. На свету повышается также связывание N-этилmaleимида с γ -субъединицей CF_1 (McCarty, 1979). Такие конформационные изменения сказываются на каталитической активности CF_1 . В отсутствие $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ на мембране CF_1 не активен и не гидролизует АТФ в присутствии протонаторов. После $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -зависимой конформационной перестройки CF_1 может быть модифицирован реагентами, восстанавливающими дисульфидные связи, или обработан трипсином таким образом, что его каталитическая активность уже не падает при низком $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Конформационные изменения в митохондриальном F_1 можно наблюдать благодаря изменению флуоресценции связанного с ферментом ингибитора — ауровертина (Slater, 1974).

Как F_1 , так и CF_1 содержат центры прочного связывания адениновых нуклеотидов. Вопрос о том, являются ли связанные в этих центрах нуклеотиды промежуточными соединениями в синтезе АТФ или они играют регуляторную роль, остается пока открытым (McCarty, 1979).

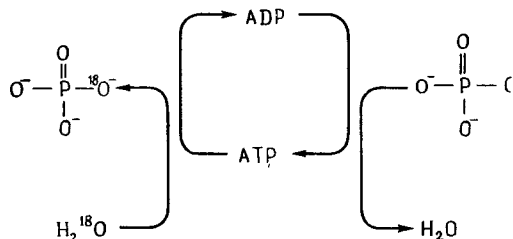


Рис. 7.7. Включение ^{18}O из воды в P_i (до четырех атомов на молекулу) указывает на обратимый синтез АТФ, связанного с АТФ-синтетазой. (Отметим, что кислород, образующий мостик между β - и γ -фосфатами в АТФ, попадает из АДФ, а не из P_i .)

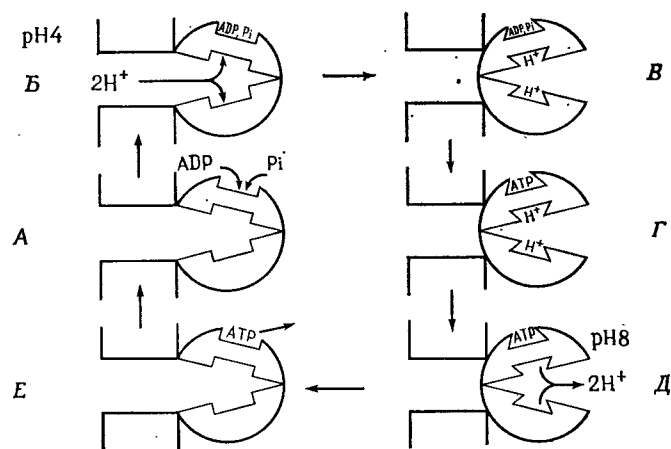


Рис. 7.8. Одна из возможных моделей функционирования АТФ-синтетазы. F_1 существует в двух конформациях: 1) депротонированная форма имеет центры связывания H^+ с низким сродством, которые контактируют с F_0 , и каталитический центр с низким сродством к субстратам; 2) протонированная форма имеет центры связывания H^+ с высоким сродством (т. е. с повышенным pK), которые не соприкасаются с F_0 ; в этой форме повышено также сродство активного центра к субстратам. А. АДФ и P_i связываются с формой 1) в каталитическом центре с низким сродством. Б. Протоны из F_0 связываются с H^+ -связывающими центрами, имеющими низкое сродство, что приводит к конформационному изменению (В) и резкому увеличению сродства активного центра. Свободная энергия для этого перехода поступает благодаря сопряженному увеличению сродства H^+ -связывающих центров. Г. АТФ, прочно связанный в активном центре, теперь образуется без значительных затрат свободной энергии. Д. Если активность протонов в среде справа (матрикс) достаточно низка, то они могут диссоциировать из связывающих центров, несмотря на их высокое pK в этом конформационном состоянии. Е. После диссоциации протонов конформация белка возвращается в исходное состояние, сродство каталитического центра снижается, и это приводит к освобождению связанного АТФ.

Важные данные о механизме синтеза АТФ были получены при изучении реакций изотопного обмена. Этот метод позволяет следить за образованием очень небольших количеств продуктов, таких, например, как связанные с ферментом промежуточные соединения. Наибольшую информацию дает обмен между H_2^{18}O и P_i . Включение нескольких (до четырех) атомов ^{18}O из H_2^{18}O в молекулу P_i , которая образуется при гидролизе АТФ, указывает на существование динамического равновесия синтеза — гидролиза АТФ в активном центре АТФ-синтетазы. Этот обмен позволяет следить за процессом синтеза АТФ независимо от стадии освобождения связанного АТФ в раствор (рис. 7.7). Он подавляется олигомицином и происходит лишь в присутствии АДФ, но не требует $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Итак, обратимый синтез АТФ в активном центре не требует энергии $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ а основной энергозависимой стадией является выход АТФ в раствор. Более детальный анализ реакций изотопного обмена указывает на то, что F_1 содержит два активных центра, которые работают поочередно (Boyer, 1977).

Сам факт конформационных изменений в F_1 еще не дает объяснения механизма сопряжения синтеза АТФ и переноса протонов. Как и в случае конформационных моделей переноса протонов в электронтранспортной цепи (разд. 5.4), конформационная модель АТФ-синтетазы должна включать ряд координированных стадий. Одна из простейших моделей показана на рис. 7.8. Согласно этой модели, энергия, запасенная в протонном электрохимическом потенциале, используется благодаря изменению сродства протонсвязывающего центра: этот центр имеет низкое сродство, когда обращен в фазу с высоким электрохимическим потенциалом (Ц-фаза), и высокое сродство к протонам, когда обращен в фазу с низким электрохимическим потенциалом протонов (М-фаза).

7.5. ТРАНСПОРТ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И P_i В МИТОХОНДРИЯХ

[Обзоры: Fonyo, 1975 (фосфатный переносчик); Vignais, 1976; Klingenberg, 1979a (транслоказа адениновых нуклеотидов)]

В бактериях и хлоропластах АТФ-синтетаза синтезирует АТФ в том же клеточном компартменте, где происходит его использование. В митохондриях, однако, АТФ синтезируется в матриксе и затем выбрасывается в цитоплазму. В суммарном процессе синтеза АТФ участвуют два переносчика: переносчик фосфата, поставляющий P_i в матрикс, и транслоказа адениновых нуклеотидов, которая переносит АДФ в матрикс и АТФ в цитоплазму (см. рис. 7.12).

Фосфатный переносчик катализирует электронейтральный

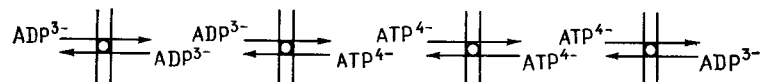


Рис. 7.9. Обменные транспортные процессы, которые катализируются транслоказой адениновых нуклеотидов.

транспорт H_2PO_4^- либо в обмен на OH^- , либо в симпорте с H^+ (эти два варианта различить невозможно). Этот переносчик блокируется ртутными соединениями, такими, как *n*-хлормеркурибензоат и мерсалил, а также *N*-этилмалеимидом, однако все эти ингибиторы не абсолютно специфичны. Фосфатный переносчик обладает очень высокой активностью. Распределение P_i через мембрану зависит от величины ΔpH , так как транспорт происходит в симпорте с протоном. Этот фактор осложняет измерения соотношения H^+/O в митохондриях с помощью техники кислородных пульсов, поскольку перераспределение P_i частично снимает ΔpH , возникающий при дыхании (разд. 4.3).

Транслоказа адениновых нуклеотидов катализирует обмен аденозинди- или трифосфатов через внутреннюю мембрану в соотношении 1:1 (рис. 7.9). Суммарный пул адениновых нуклеотидов в матриксе ($\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$) остается неизменным, так как перенос моля нуклеотида из цитоплазмы автоматически компенсируется выбросом моля нуклеотида из матрикса. Даже если митохондрии суспендированы в среде, не содержащей нуклеотидов (как это происходит при их выделении), потеря нуклеотидов обычно не наблюдается.

Транслоказа специфична к ATP и ADP (но не к AMP). Существует целый ряд специфических ингибиторов транслоказы. Так, например, атрактилэзид — глюкозид, выделенный из средиземноморского чертополоха *Atractylis gummifera*, — является конкурентным ингибитором связывания и транспорта адениновых нуклеотидов. С ним сходен карбоксиатрактиллат, который связывается с ферментом значительно прочнее ($K_d = 10^{-8} \text{ M}$) и не вытесняется адениновыми нуклеотидами. Другой ингибитор — бонгкрековая кислота — вырабатывается *Pseudomonas cocovenenans*. Свое название она получила в связи с тем, что была обнаружена как токсичная примесь в пищевом продукте из кокосовых орехов — бонгкреке. Бонгкрековая кислота является неконкурентным ингибитором транслоказы.

Клингенбергом (Klingenberg, 1979a) была предложена модель функционирования транслоказы, согласно которой она может существовать в двух состояниях, которые различаются ориентацией единственного нуклеотидсвязывающего центра (рис. 7.10). Состояние «Ц», в котором этот центр доступен со стороны цитоплазмы, фиксируется карбоксиатрактиллатом, а состояние «М» — бонгкрековой кислотой.

Для того чтобы идентифицировать во внутренней мембране

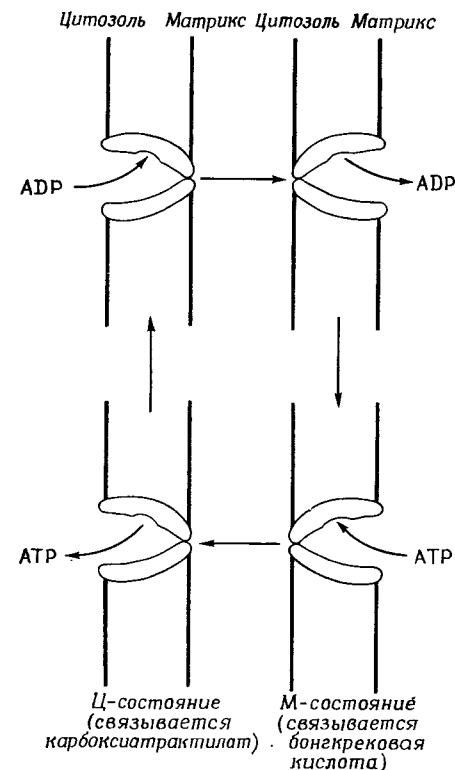


Рис. 7.10. Модель работы транслоказы адениновых нуклеотидов (Klingenberg, 1979a).

митохондрий пептид, ответственный за перенос адениновых нуклеотидов, были использованы два подхода. Первый подход основан на выделении комплекса ^{35}S -карбоксиатрактиллата с митохондриями сердца быка. Комплекс оказался очень стабильным: он не распадался после солюбилизации мембраны с помощью неионного детергента тритона X-100 и при последующей очистке. Ингибитор позволяет идентифицировать пептид и защищает его от инактивации при выделении. Практически вся метка в этих опытах оказывается связанной с белком с мол. массой $\sim 30\,000$ — $40\,000$. Второй подход основан на использовании фотоаффинных аналогов адениновых нуклеотидов, которые в темноте связываются с активным центром переносчика и являются конкурентными ингибиторами транспорта. После освещения ультрафиолетовым светом от них отщепляется N_2 и образуется очень активный свободный радикал нитрена, который ковалентно связывается с ближайшим пептидом, т. е. в данном случае с транслоказой.

Нуклеотидсвязывающий белок имеет мол. массу $\sim 30\,000$. Количество меченых нуклеотидов, связавшихся с белком, указывает на то, что интактная транслоказа работает в виде димера с мол. массой 60 000. В митохондриях сердца транслоказа является наиболее массовым белком внутренней мембраны.

В отсутствие мембранного потенциала транслоказа переносит ATP и ADP симметрично (т. е. с равной эффективностью в обоих направлениях). Однако в условиях нормального дыхания происходит преимущественно захват ADP и выброс ATP, что соответствует физиологическому направлению обмена. Эта асимметрия определяется разницей в величине заряда двух нуклеотидов. ATP транспортируется в форме ATP^{4-} , а ADP — в форме ADP^{3-} . Такое неравенство зарядов означает, что равновесие реакции обмена изменяется в 10 раз на каждые 60 мВ мембранного потенциала (рис. 7.11).

Полная система синтеза ATP в митохондриях и его экспорта, включающая ATP-синтазу, транслоказу адениновых нуклеотидов и фосфатный переносчик, показана на рис. 7.12. Совместное действие фосфатного переносчика и транслоказы адениновых нуклеотидов приводит к переносу в матрикс одного

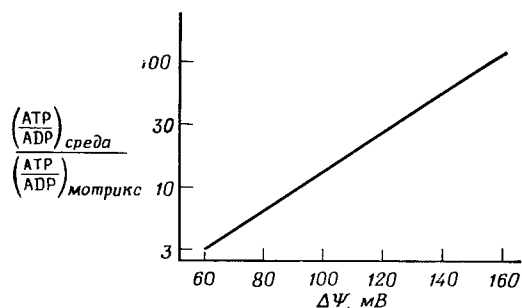


Рис. 7.11. Влияние мембранного потенциала на равновесие обмена адениновых нуклеотидов с помощью транслоказы (Klingenberg, Roitenberg, 1977). Если при обмене ADP на ATP происходит суммарный перенос одного заряда, то можно предсказать (разд. 3.5), что соотношение ATP/ADP в матриксе будет понижаться по сравнению со средой в 10 раз на каждые 60 мВ мембранного потенциала в условиях равновесия. Это было проверено Клингенбергом и Роттенбергом (Klingenberg, Rottenberg, 1977). Митохондрии инкубировали в среде, содержащей валиномицин, и $\Delta\psi$ определяли по распределению $^{86}\text{Rb}^+$ (разд. 4.2). Среда содержала ^{14}C -ATP, ^{14}C -ADP, олигомицин, блокирующий ATP-синтазу (разд. 7.2), и сукцинат в качестве субстрата дыхания. $\Delta\psi$ варьировали от 60 до 170 мВ, изменяя концентрацию K^+ в среде от 20 до 0,5 мМ. После того как устанавливалось равновесное распределение адениновых нуклеотидов, митохондрии выделяли из инкубационной среды с помощью центрифугирования через силиконовое масло (рис. 4.5). Затем определяли содержание ATP и ADP в среде и в митохондриях. Различия в соотношении ATP/ADP в среде и матриксе возрастало при увеличении $\Delta\psi$, и при $\Delta\psi$, равном 160 мВ, соотношение ATP/ADP в среде было в 125 раз выше, чем в матриксе.

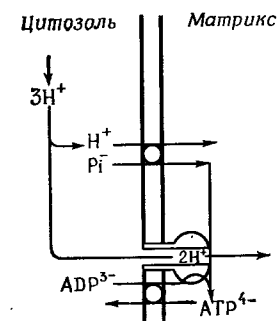
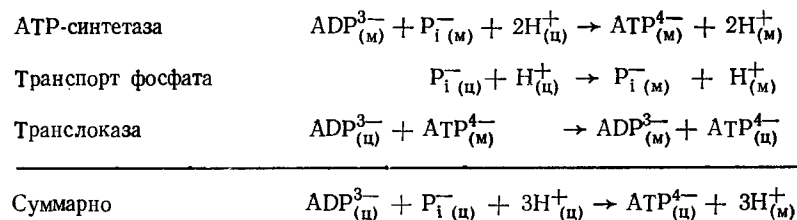


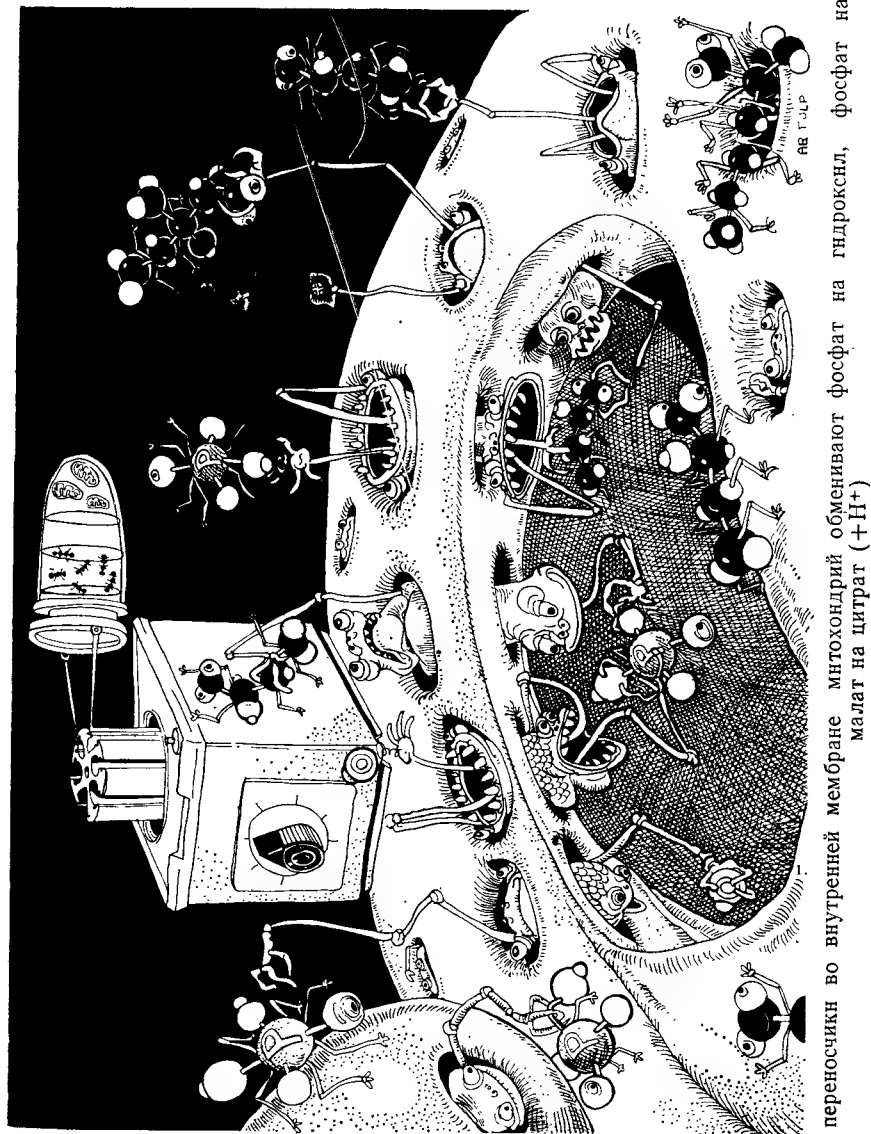
Рис. 7.12. Перенос ADP и P_i в матрикс и выброс ATP сопровождаются переносом одного дополнительного протона. (Для простоты антипорт P_i/OH^- показан как эквивалент симпорта H^+/P_i)



Индексы означают: м — матрикс, ц — цитозоль.

дополнительного протона на каждую синтезированную молекулу ATP. Этот протон переносится совместно с P_i электронейтрально. Для поддержания асимметрии электрогенного обмена ADP^{3-} на ATP^{4-} используется заряд еще одного протона.

Такое протекание суммарного процесса приводит к важным термодинамическим последствиям. Во-первых, треть свободной энергии, накапливаемой в цитоплазматическом пуле $\text{ATP}/\text{ADP} + \text{P}_i$, поступает не от собственно ATP-синтазы, а в результате протекания последующих транспортных процессов. Во-вторых, поскольку для синтеза цитоплазматического ATP используются три протона, а для ATP в матриксе лишь два, ΔG_p в цитоплазме в состоянии 4 (разд. 3.2) может превышать на 50% ΔG_p , поддерживаемый в матриксе или при работе вывернутых субмитохондриальных частиц. Действительно, было установлено, что в изолированных митохондриях ΔG_p достигает $64 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (Slater et al., 1973), а в случае субмитохондриальных частиц не превышает $50 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. Тот факт, что для синтеза ATP используются три протона, необходимо учитывать при рассмотрении гипотетических механизмов переноса протонов в дыхательной цепи (разд. 4.3).



Различные переносчики во внутренней мембране митохондрий обменивают фосфат на гидроксил, фосфат на малат и малат на цитрат ($+H^+$)

Глава 8

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИМИ ОРГАНЕЛЛАМИ И ОКРУЖАЮЩЕЙ ИХ СРЕДОЙ

8.1. ВВЕДЕНИЕ

Биоэнергетические органеллы функционируют лишь в условиях постоянного обмена метаболитами и конечными продуктами с цитоплазмой клетки (в случае митохондрий и хлоропластов) или с внешней средой (в случае бактерий). Кроме того, органеллы регулируют свой ионный состав и одновременно поддерживают высокий $\Delta\tilde{n}^+$, необходимый для синтеза АТФ. Совместное осуществление этих функций достигается благодаря работе систем переносчиков ионов и метаболитов. Их мы и рассмотрим в этой главе.

8.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСПОРТА МЕТАБОЛИТОВ

(Обзоры: Palmieri, Klingenberg, 1979; La Noue, Schoolwerth, 1979)

Данный раздел посвящен прежде всего методам исследования транспорта метаболитов в митохондриях. Здесь следует отметить, что эти методы приложимы также и к другим системам.

Основные методические проблемы при изучении органелл связаны с тем, что скорости транспортных процессов в них высоки, а внутренний объем мал. Если большинство транспортных процессов через плазматическую мембрану эукариотической клетки имеет характерные времена порядка нескольких часов, то транспорт через внутреннюю мембрану митохондрий (как односторонний, так и обменный) достигает стационарного состояния в течение нескольких секунд.

Один из быстрых качественных методов определения транспорта метаболитов основан на измерении осмотического набухания матрикса при накоплении в нем растворимых веществ (разд. 2.7). Если недышащие митохондрии суспендированы в изоосмотической среде, то их набухание и последующее снижение светорассеяния будут наблюдаться лишь при условии одновременного транспорта аниона и катиона и соблюдении баланса зарядов и pH (разд. 2.7). Накопление метаболитов часто связано с симпортом протонов. В этом случае закисление матрикса можно предотвратить, добавляя соли аммония: NH_3 является проникающим веществом (разд. 2.4), а после протонирования в матриксе образуется NH_4^+ , который не проникает через мембрану.

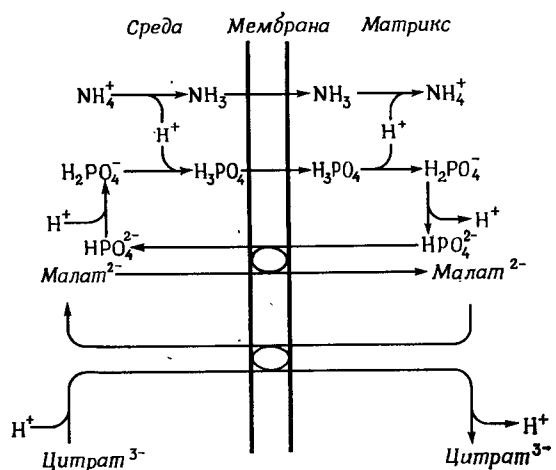
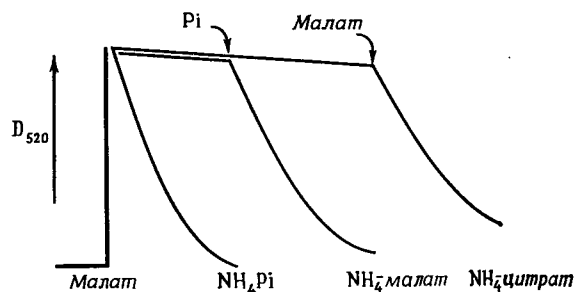


Рис. 8.1. Аммонийное набухание и перенос метаболитов в митохондриях.

Метод «аммонийного набухания» был разработан Чэппеллом (Chappell, 1968) для изучения электронейтральных транспортных систем. Было показано, что транспорт фосфата (разд. 7.6) эквивалентен симпорту $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (рис. 8.1), так как в присутствии фосфата аммония наблюдалось быстрое набухание. Набухание в присутствии малата аммония наблюдалось лишь при наличии в среде P_i , что свидетельствует о связи между фосфатным переносчиком и фосфат-малатным обменом. Для набухания в присутствии цитрата аммония требуется как P_i , так и малат, что указывает на трехстадийную систему обмена.

Метод набухания трудно использовать для количественных измерений транспорта. Он требует очень высоких (изоосмотических) концентраций анионов. Более прямой метод, позволяющий обойти эти трудности, основан на измерении транспорта

или обмена меченых метаболитов между внешней средой и матриксом митохондрий. Высокая скорость, с которой выравниваются концентрации метаболитов в матриксе и внешней среде, требует применения быстрых методов для изучения кинетики транспорта. Чаще других используют технику центрифугирования органелл через силиконовое масло (рис. 4.5). Временное разрешение метода можно повысить, если останавливать транспорт перед центрифугированием добавлением специфического ингибитора. С помощью этого подхода можно достичь временного разрешения менее одной секунды. В настоящее время разработаны автоматические системы, позволяющие последовательно отбирать ряд образцов из инкубационной смеси и определять таким образом кинетику транспорта.

Большинство митохондриальных транспортных систем катализирует обменные реакции. Поэтому, чтобы получить достоверные результаты по транспорту метаболита, необходимо предварительно нагрузить митохондрии веществом, на которое он обменивается.

8.3. ПЕРЕНОСЧИКИ МЕТАБОЛИТОВ В МИТОХОНДРИЯХ

(Обзоры: Meijer, Van Dam, 1974; La Noue, Schoolwerth, 1979)

В табл. 8.1 приведен список основных переносчиков метаболитов, которые были обнаружены во внутренней мембране митохондрий; однако, возможно, этот список не полон. Транслоказу адениновых нуклеотидов и фосфатный переносчик мы уже рассмотрели выше в связи с синтезом АТФ (разд. 7.6). Поскольку окислительное фосфорилирование является универсальной функцией митохондрий, эти два переносчика всегда в них присутствуют. Основными субстратами митохондрий *in vivo* являются пируват и жирные кислоты, поэтому переносчики пирувата и карнитина также широко распространены. Существование специфического переносчика пирувата было твердо установлено лишь относительно недавно. Дело в том, что пируват является монокربоновой кислотой, и предполагалось, что он может проникать через липидный бислой без участия переносчика, как это происходит в случае ацетата (разд. 2.4). Однако кинетика с насыщением и существование специфического ингибитора транспорта — цианогидроксициннамата убедительно доказали участие в этом процессе переносчика. Как и в случае многих других переносчиков, здесь происходит либо антипорт пируват $^-$ /ОН $^-$, либо симпорт пируват $^-$ /Н $^+$, что нельзя различить в условиях эксперимента.

Переносчик карнитина также был обнаружен недавно. Ранее предполагалось, что транспорт ацилкарнитина является

Таблица 8.1

Переносчики метаболитов в митохондриях

Переносчик	Функция	Ингибиторы
а) Транслоказа адениновых нуклеотидов	$ADP^{3-} \rightarrow ATP^{4-}$	Атрактилат Карбоксиаттрактилат Бонгкреовая кислота
б) Фосфатный	$P_i^- \rightarrow OH^-$	Сульфгидрильные реагенты (N-этилmaleимид, мерсалил)
в) Дикарбоксилатный	$Малат^{2-} \rightarrow P_i^{2-}$	Бутилмалонат
г) Трикарбоксилатный	$Цитрат^{5-} + H^+ \rightarrow Малат^{2-}$	1, 2, 3-бензилтрикарбоксилат
д) 2-Оксоглутаратный	$2-OG^{2-} \rightarrow Малат^{2-}$	Фенилсукцинат
е) Глутамат-аспаратный	$Glu^{2-} + H^+ \rightarrow Asp^{2-}$	—
ж) Глутаматный	$Glu^- \rightarrow OH^-$	—
з) Пируватный	$Пир^- \rightarrow OH^-$	—
и) Карнитиновый	$Ацилкарнитин^+ \rightarrow Карнитин^+$	Цианогидроксицинамат
к) Орнитиновый	$Орнитин \rightarrow H^+$	—

примером механизма транслокации групп (разд. 1.4), где лишь ацильная группа, но не карнитин пересекает мембрану. Переносчик карнитина способен обменивать карнитин на ацилкарнитин, а также на коротко- или длинноцепочечные ацилкарнитины.

Во многих митохондриях существуют также переносчик 2-оксоглутарата (α -кетоглутарата) и глутамат-аспаратный обменник (табл. 8.1). Вместе они участвуют в челночном механизме малат-аспаратного обмена (рис. 8.2), который позволяет дыхательной цепи окислять цитоплазматический NADH, несмотря на то что внутренняя мембрана непроницаема для нук-

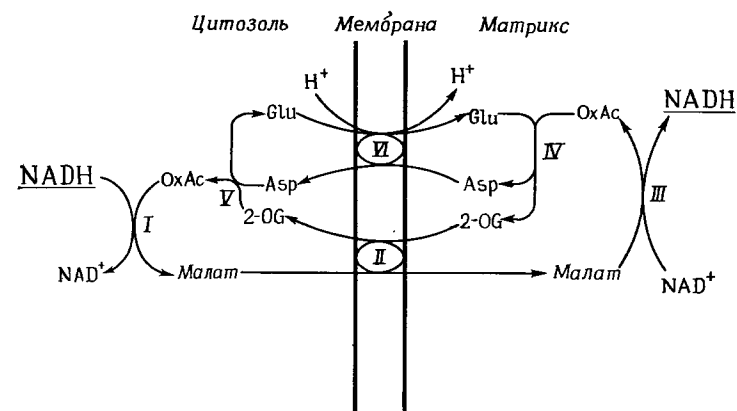


Рис. 8.2. Глутамат-аспаратный цикл и окисление цитоплазматического NADH. I — цитоплазматический NADH окисляется цитоплазматической малатдегидрогеназой; II — малат переносится в матрикс в обмен на 2-оксоглутарат (2-OG); III — малат реокисляется до оксалоацетата (OxAc) малатдегидрогеназой матрикса с образованием NADH в матриксе; IV — между оксалоацетатом и глутаматом в матриксе происходит трансаминирование и образуются аспартат и 2-оксоглутарат, который затем выходит наружу в обмен на малат; V — в цитозоле происходит трансаминирование между 2-оксоглутаратом и аспартатом и регенерируется оксалоацетат и глутамат, который затем переносится в матрикс в симпорте с протоном и в обмен на аспартат (VI).

леотидов. Этот механизм позволяет ответить на вопрос, почему E_h пары $NAD^+/NADH$ в цитоплазме заметно выше (т. е. NADH менее восстановлен), чем в матриксе. Это термодинамическое неравенство определяется электрогенностью глутамат-аспаратного переносчика, который обменивает Glu^{2-} и протон на Asp^{2-} . Таким образом, если на мембране существует $\Delta\mu_{H^+}$, этот процесс будет смещен в сторону накопления глутамата и выброса аспартата.

Еще один путь окисления цитоплазматического NADH возникает при работе α -глицерофосфатного челнока (рис. 8.3).

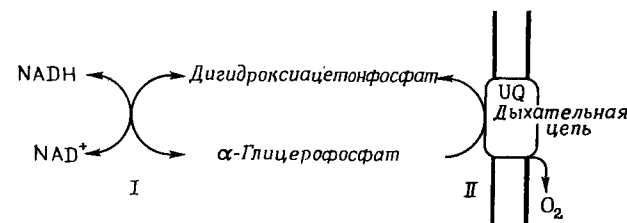


Рис. 8.3. α -Глицерофосфатный челночный механизм окисления цитоплазматического NADH. I — цитоплазматическая NAD^+ -зависимая дегидрогеназа, II — митохондриальный фермент.

В этом механизме участвуют две дегидрогеназы α -глицерофосфата, присутствующие в большинстве клеток. Цитоплазматический фермент окисляет NADH сопряженно с образованием α -глицерофосфата из дигидроксиацетонфосфата, а фермент, локализованный на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий, окисляет α -глицерофосфат, подавая электроны прямо на UQ в дыхательной цепи. В этом случае направление процесса задается тем, что электроны передаются в пул хинонов при потенциале, близком к нулю (рис. 5.11).

Дикарбоксилатный и трикарбоксилатный переносчики весьма активны в митохондриях печени, но практически отсутствуют в миокарде. Оба они обеспечивают выброс из матрикса промежуточных соединений цикла трикарбоновых кислот, которые используются для глюконеогенеза и синтеза жирных кислот. Эти переносчики электро нейтральны. В случае трикарбоксилатного переносчика это достигается благодаря симпорту протона с цитратом.

8.4. ТРАНСПОРТ КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

(Обзоры: Bygrave, 1977; Carafoli, Crompton, 1977; Nicholls, Crompton, 1980; Saris, Åkerman, 1980)

Необычайную способность митохондрий к накоплению Ca^{2+} довольно просто объяснить в рамках хемиосмотической теории. Действительно, электрогенный транспорт двухзарядного катиона через мембрану, на которой поддерживается мембранный потенциал около 180 мВ, ведет к созданию равновесного градиента концентрации не менее 10^6 (рис. 3.5). Однако в связи с таким большим накоплением Ca^{2+} возникают проблемы на уровне всей клетки. Можно полагать, что присутствие в матриксе P_i предотвращает повышение в нем свободной концентрации Ca^{2+} более чем до 1 мМ, и, следовательно, равновесная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме не должна превышать 10^{-9} М. В то же время большинство измерений концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме дает величины порядка 10^{-6} — 10^{-7} М. Единственный электрогенный переносчик Ca^{2+} представляется не только слишком мощной, но и плохо регулируемой системой. Распределение Ca^{2+} между матриксом и цитоплазмой оказывается в этом случае жестко связанным с величиной мембранного потенциала [уравнение (3.29)], что может неблагоприятно отразиться на синтезе АТФ и распределении метаболитов.

Решение этой проблемы было найдено после открытия независимых механизмов выброса Ca^{2+} в митохондриях печени (Puskin et al., 1976) и сердца (Crompton, Carafoli, 1976). В случае митохондрий сердца, мозга и бурого жира ионы Ca^{2+} выбрасываются в обмен на Na^+ , а в случае печени они обмени-

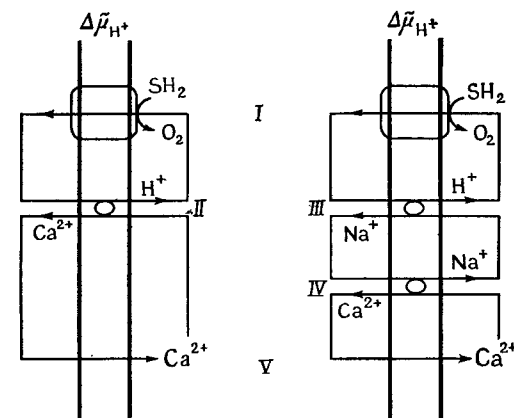


Рис. 8.4. Стационарный циклический перенос Ca^{2+} в митохондриях печени (слева) и сердца (справа). I — дыхательная цепь; II — $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмен в митохондриях печени; III — Na^+/H^+ -обмен в митохондриях сердца; IV — $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -обмен в митохондриях сердца; V — Ca^{2+} -унипортер. Стехиометрии на рисунке не показаны.

ваются на протоны (рис. 8.4). Поскольку равновесное распределение ионов Ca^{2+} при их выбросе и при работе унипортера различно (рис. 3.4), возникает медленный постоянный циклический ток Ca^{2+} через мембрану, что приводит к небольшому снижению $\Delta\psi_{H^+}$ (рис. 8.4). Такая система с различными путями выброса и входа ионов Ca^{2+} обладает целым рядом преимуществ. Стационарный градиент концентрации Ca^{2+} может быть в этом случае значительно ниже 10^6 , причем он может регулироваться за счет изменения кинетических параметров любого из транспортных путей без изменения $\Delta\psi$ и синтеза АТФ. Наконец, как и в случае любой циклической системы, регуляция может быть очень чувствительна: небольшое изменение скорости каждого из транспортных процессов может приводить к большому относительному изменению суммарного потока.

Существует целый ряд различных методов изучения транспорта Ca^{2+} в митохондриях. Кроме прямого измерения концентрации Ca^{2+} с помощью атомной абсорбционной спектроскопии можно использовать изотопные методы с применением $^{45}\text{Ca}^{2+}$, Ca^{2+} -селективные электроды, а также металлохромные индикаторы, такие, как арсеназо III, которые меняют свой спектр при связывании Ca^{2+} (Scarpa, 1979).

Существование независимого пути выхода Ca^{2+} легко показать, если избирательно блокировать ингибитором путь входа после того, как достигнуто стационарное состояние. Одним из таких ингибиторов служит рутениевый красный — реагент на

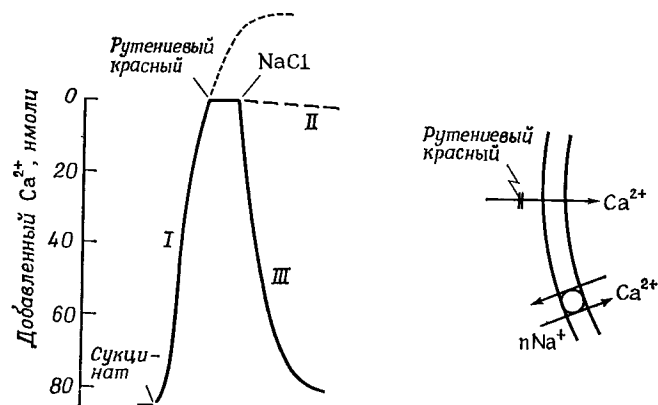


Рис. 8.5. Na^+ -Зависимый выход Ca^{2+} из митохондрий сердца (Crompton et al., 1976). Митохондрии из сердца инкубировали в среде с KCl в присутствии 70 нмоль Ca^{2+} на 1 мг белка. После добавки субстрата (сукцината) наблюдалось поглощение Ca^{2+} за счет работы унипортера (I), система выброса Ca^{2+} при этом не функционирует, так как в среде отсутствует Na^+ . После добавки рутениевого красного, блокирующего унипортер, транспорт Ca^{2+} практически прекращается (II). Затем был добавлен 13 мМ NaCl , механизм выброса активировался и наблюдался полный выход накопленного Ca^{2+} , поскольку унипортер по-прежнему был блокирован (III).

гликопротеины, который ингибирует Ca^{2+} -унипортер в очень низких концентрациях. Путь выхода при этом не затрагивается, и можно наблюдать выход Ca^{2+} из матрикса (рис. 8.5), даже если $\Delta\psi$ слишком высок для того, чтобы выход происходил за счет обращения унипортера. Унипортер можно также блокировать некоторыми поликатионами, такими, как Mg^{2+} и лантаноиды (они подавляют и выход Ca^{2+} , но в более высоких концентрациях).

Стационарный циклический ток Ca^{2+} , H^+ и Na^+ (в митохондриях сердца) не сопровождается переносом значительного количества ионов через мембрану (рис. 8.4). В то же время при суммарном накоплении Ca^{2+} перенос катиона должен быть скомпенсирован. В отсутствие проникающей слабой кислоты перенос зарядов при накоплении Ca^{2+} компенсируется за счет выброса протонов при работе дыхательной цепи со стехиометрией $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Это приводит к быстрому повышению ΔpH и снижению $\Delta\psi$ на мембране [$\Delta\mu_{\text{H}^+}$ остается примерно постоянным (рис. 4.8)]. В этих условиях, например в присутствии N-этилmaleимида, блокирующего перенос эндогенного P_i (разд. 7.6), быстро возникает ΔpH около двух единиц, и значительного накопления Ca^{2+} не происходит.

Если в среде присутствует проникающая слабая кислота, то, накапливаясь в матриксе, она приведет к рассеиванию ΔpH ,

возрастанию $\Delta\psi$ и дальнейшему накоплению Ca^{2+} . Такой кислотой может служить, например, уксусная. Фосфат же не только рассеивает ΔpH , но и образует в матриксе нерастворимый комплекс $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, что приводит к накоплению очень больших количеств Ca^{2+} . Иногда, по неясным еще причинам, митохондрии могут набухать, снижать свой мембранный потенциал и терять накопленный Ca^{2+} . Этот выброс можно усилить, добавив фосфоенолпируват, атрактилат, или окислив NAD(P)H в матриксе (например, с помощью ацетоацетата), или предотвратить, добавив в среду АТФ или АДФ в низких концентрациях.

Выход Ca^{2+} в последнем случае не следует путать с описанным выше путем выхода, который не связан со снижением $\Delta\psi$.

8.5. ТРАНСПОРТ В БАКТЕРИЯХ

(Обзоры: Hamilton, 1975, 1977; Harold, 1977; Wilson, 1978)

Бактерии приспособлены к жизни в гораздо более вариабельных и обычно менее благоприятных условиях окружающей среды, чем митохондрии или хлоропласты. В результате бактерии приобрели целый ряд систем для транспорта субстратов, таких, как аминокислоты и сахара. Первоначально хемиосмотическая теория Митчелла возникла из попыток объяснить механизм «активного транспорта» в бактериях. Интересно отметить поэтому, что одна из бактериальных транспортных систем — фосфотрансферазная — представляет собой пример механизма, наиболее близкого к гипотетическому механизму «векторной транслокации групп». Второй класс бактериальных транспортных систем — это «хемиосмотические» механизмы, сопряженные с переносом протонов; третий включает ряд помп, использующих энергию гидролиза АТФ.

Различные варианты хемиосмотических механизмов транспорта представлены на рис. 8.6. Простейший из них — это унипорт положительно заряженных метаболитов, например лизина, когда равновесное распределение катиона определяется величиной мембранного потенциала. Незаряженные метаболиты, такие, как изолейцин, могут транспортироваться в симпорте с протоном, так что их накопление определяется величиной суммарного $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Анионные субстраты также могут переноситься в симпорте с протоном, но их распределение зависит лишь от величины ΔpH . Нет никаких оснований, чтобы а priori исключать возможность существования различных стехиометрических соотношений при транспорте протонов и метаболитов (Rottenberg, 1976).

Пожалуй, лучше других доказан хемиосмотический механизм транспорта лактозы и других β -галактозидов с помощью *lac*-пермеазы *E. coli* (рис. 1.13; West, Mitchell, 1972, 1973).

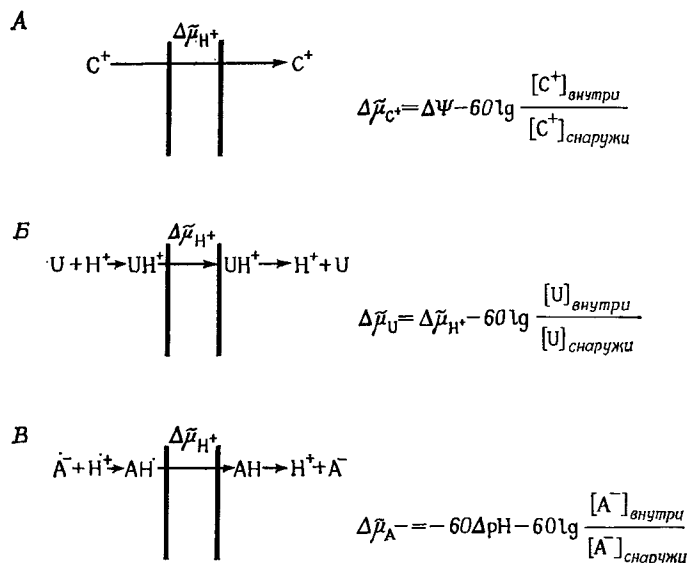


Рис. 8.6. Хемиосмотические механизмы накопления веществ в бактериях. А. Катионы (C^+). Б. Незаряженные вещества (U). В. Анионы (A^-).

Транспорт незаряженной лактозы или ее неметаболизируемого аналога — тиометилгалактозида сопряжен с симпортом одного протона.

АТР-зависимый транспорт метаболитов был обнаружен у многих видов грамотрицательных бактерий. В этих случаях транспорт, как правило, зависит от специфических связывающих белков, локализованных в периплазматическом пространстве и имеющих мол. массы 20 000—40 000. Эти белки специфически и с высоким сродством связывают определенный метаболит. Описано более 20 видов таких белков. При осмотическом разрушении клеточной стенки эти белки выходят из периплазмы и АТР-зависимый транспорт нарушается. Связывающие белки не являются переносчиками *per se*, но они сообщают транспортным системам специфичность и высокое сродство к субстратам. До сих пор неясно, существует ли единая АТР-зависимая транспортная система для многих веществ или для каждого субстрата своя.

Чувствительность к осмотическому шоку является одним из критериев, который позволяет различать $\Delta\psi_{H^+}$ -зависимые и АТР-зависимые механизмы. Кроме того, $\Delta\psi_{H^+}$ -зависимые транспорты чувствительны к протонофорам, устойчивы к арсенату (который приводит к исчерпанию АТР в клетке) и требуют

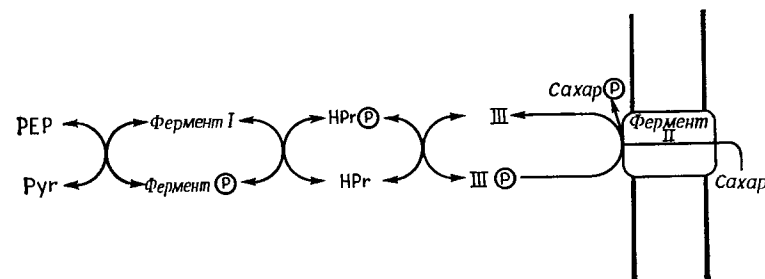


Рис. 8.7. Фосфотрансферная система транспорта сахаров.

присутствия субстратов дыхания, если АТР-синтетаза инактивирована в результате мутации. Напротив, АТР-зависимые транспортные системы, чувствительные к осмотическому шоку, устойчивы к действию протонофоров, блокируются арсенатом и в мутантных бактериях с неактивной АТР-синтетазой зависят от гликолиза, а не от дыхания. АТР-зависимые транспортные системы существуют и у грамположительных бактерий, однако в этом случае в них не входят периплазматические связывающие белки.

Третий тип транспортных механизмов — это фосфотрансферная система, катализирующая транспорт многих сахаров, включая глюкозу, в таких бактериях, как *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. Отличительной чертой этой системы является то, что фосфорилирование транспортируемых сахаров, необходимое для их дальнейшего метаболизма, совмещено с самим процессом транспорта по механизму «транслокации групп» (рис. 8.7). Эти системы характерны для облигатных и факультативных анаэробов и отсутствуют у аэробных бактерий. Фосфотрансферная система обеспечивает транспорт всех сахаров у *S. aureus* и лишь некоторых, таких, как глюкоза, у *E. coli*. В качестве донора фосфата используется фосфонолпируват, который фосфорилирует фермент I. Этот фермент далее фосфорилирует небольшой термостабильный белок HPr. Оба этих компонента являются конститутивными. Они легко отделяются от мембраны и не проявляют специфичности к различным сахарам. В *S. aureus* фосфатная группа переносится на растворимый фактор III, который обладает специфичностью к сахарам. Этот фактор (белок) состоит из трех субъединиц с мол. массой 12 000, каждая из которых может связывать один фосфатный остаток. В конечном счете образуется тройной комплекс между фосфорилированным фактором III, сахаром и связанным с мембраной сахароспецифичным ферментом II. Далее происходит перенос фосфата от фактора III на сахар и собственно транспорт.

- Akerman K. E. O., Wikström M. K. F. (1976). *FEBS Lett.*, **68**, 191—197.
- Avron M. (1977). *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 143—155.
- Avron M. (1978). *FEBS Lett.*, **96**, 225—232.
- Banks B. E. C., Vernon C. A. (1978). *Trends Biochem. Sci.*, **3**, N156—N158.
- Bashford C. L., Smith J. C. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 569—586.
- Beinert H. (1978). *Methods Enzymol.*, **54**, 133—150.
- Bennett J. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 268—271.
- Blankenship R. E., Parson W. W. (1978). *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 635—653.
- Blok M. C., Hellingwerf K. J., van Dam K. (1977). *FEBS Lett.*, **76**, 45—50.
- Boyer P. D. (1965). In: *Oxidases and Related Redox Systems* (T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, ed.), pp. 994—1008, New York, Wiley.
- Boyer P. D. (1977). *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 38—41.
- Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E. C. (1977). *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 955—1026.
- Brand M. D. (1977). *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1615—1620.
- Brand M. D., Reynafarje B., Lehninger A. L. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 437—441.
- Brand M. D., Harper W. G., Nicholls D. G., Ingledew W. J. (1978). *FEBS Lett.*, **95**, 125—129.
- Bygrave F. L. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.*, **6**, 259—318.
- Carafoli E., Crompton M. (1977). *Curr. Topics Membr. Trans.*, **10**, 151—216.
- Chance B., Williams G. R. (1955). *J. Biol. Chem.*, **217**, 409—427.
- Chappell J. B. (1968). *Brit. Med. Bull.*, **24**, 150—157.
- Chappell J. B. (1977). *ATP, Carolina Biology Reader 50*. Carolina Biological Supply Co., Burlington, N. Carolina, USA.
- Chappell J. B. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N3—N4.
- Chappell J. B., Crofts A. R. (1966). In: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E. C. Slater, eds.), pp. 293—314, Elsevier, Amsterdam.
- Chappell J. B., Haerhoff K. N. (1967). In: *Biochemistry of Mitochondria* (E. C. Slater, Z. Kaniuga and L. Wojtchak, eds.), pp. 75—91, Academic Press, London and New York.
- Clayton R. K., Sistrom W. R. (1979). *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum, New York.
- Crofts A. R., Wood P. M. (1977). *Curr. Topics Bioenergetics*, **7**, 175—244.
- Crompton M., Carafoli E. (1979). *Methods Enzymol.*, **56**, 338—352.
- Crompton M., Capano M., Carafoli E. (1976). *Eur. J. Biochem.*, **69**, 453—462.
- Dawson A. G. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 171—176.
- DePierre J. W., Ernster L. (1977). *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 201—262.
- Downie J. A., Gibson F., Cox G. B. (1979). *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 103—132.
- Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. A., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemecek I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Y., Skulachev V. P. (1974). *Nature (London)*, **249**, 321—324.
- Dutton P. L. (1978). *Methods Enzymol.*, **54**, 411—435.
- Dutton P. L., Prince R. C. (1978). In: *The Photosynthetic Bacteria* (R. K. Clayton and W. R. Sistrom, eds.), pp. 525—570, Plenum, New York.
- Dutton P. L., Wilson D. F. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 165—212.
- Eisenbach M., Caplan S. R. (1977). *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 245—247.
- Eisenbach M., Caplan S. R. (1979). *Curr. Topics Membr. Trans.*, **12**, 165—248.
- Erecinska M., Veech R. L., Wilson D. F. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 412—421.
- Ernster L., Lee C. P. (1964). *Annu. Rev. Biochem.*, **33**, 729—788.
- Ferguson S. J., Jones O. T. G., Kell D. B., Sorgato M. C. (1979). *Biochem. J.*, **180**, 75—85.
- Fillingame R. H. (1980). *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 1079—1113.
- Fonyo A., Ligeti E., Palmieri F., Quagliariello E. (1975). In: *Biomembranes, Structure and Function* (G. Gardos and I. Szasz, eds.), pp. 287—306, North-Holland, Elsevier.
- Garland P. B. (1978). *Nature (London)*, **276**, 8—9.
- Gibson F., Cox G. B., Downie J. A. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 260—263.
- Gingras G. (1978). In: *The Photosynthetic Bacteria* (R. K. Clayton and W. R. Sistrom, eds.), pp. 119—131, Plenum, New York.
- Gomez-Poyou A., Gomez-Lojero C. (1977). *Curr. Bioenerg.*, **6**, 221—257.
- Greville G. D. (1969). *Curr. Topics Bioenerg.*, **3**, 1—78.
- Gromet-Elhanan Z. (1977). *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 275—277.
- Haddock B. A. (1980). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 290**, 329—339.
- Haddock B. A., Jones C. W. (1977). *Bact. Rev.*, **41**, 47—99.
- Hamilton W. A. (1975). *Advan. Microbiol. Physiol.*, **12**, 1—53.
- Hamilton W. A. (1977). In: *Microbial Energetics* (B. A. Haddock and W. A. Hamilton, eds.), pp. 185—216, Cambridge University Press, Cambridge.
- Harmon H. J., Hall J. D., Crane F. L. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 119—155.
- Harold F. M. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.*, **6**, 84—149.
- Hatefi Y. (1978). *Methods Enzymol.*, **53**, 3—5 et seq.
- Hatefi Y., Haavik A. G., Fowler L. R., Griffiths D. E. (1962). *J. Biol. Chem.*, **237**, 2661—2669.
- Hauska G., Trebst A. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.*, **6**, 151—220.
- Henderson P. J. F. (1971). *Annu. Rev. Microbiol.*, **25**, 393—428.
- Henderson R., Unwin P. N. T. (1975). *Nature (London)*, **257**, 28—32.
- Hill R. (1965). *Essays Biochem.*, **1**, 121—151.
- Hinkle P. C., Mitchell P. (1970). *Bioenergetics*, **1**, 45—60.
- Höjberg B., Rydström J. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 275—283.
- Ingledew W. J., Cox J. C., Halling P. J. (1977). *FEMS Microbiol. Lett.*, **2**, 193—197.
- Jagendorf A. T. (1975). In: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 413—492, Academic Press, New York and London.
- Jagendorf A. T., Uribe E. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 170—177.
- John P., Whatley F. R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 129—153.
- Jones C. W. (1977). In: *Microbial Energetics* (B. A. Haddock and W. A. Hamilton, eds.), pp. 23—59, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones O. T. G. (1977). In: *Microbial Energetics* (B. A. Haddock and W. A. Hamilton, eds.), pp. 151—183, Cambridge University Press, Cambridge.
- Junge W. (1977). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 503—536.
- Junge W., Witt H. T. (1968). *Z. Naturforsch. Teil. B*, **23**, 244—254.
- Kaback H. R. (1974). *Science*, **186**, 882—892.
- Kagawa Y. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 297—338.
- Kagawa Y. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 45—93.
- Kagawa Y., Kandrach A., Racker E. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 676—684.
- Kagawa Y., Sone N., Hirata H., Yoshida M. (1979). *Trands Biochem. Sci.*, **4**, 31—33.
- Kell D. B. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 54—99.
- Klingenberg M. (1979a). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 249—252.
- Klingenberg M. (1979b). *Methods Enzymol.*, **56**, 229—232.
- Klingenberg M., Rottenberg H. (1977). *Eur. J. Biochem.*, **73**, 125—130.
- Konings W. N. (1979). *Methods Enzymol.*, **56**, 378—388.
- Kozlov I. A., Skulachev V. P. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 29—89.
- Kröger A. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 129—145.
- Kröger A., Klingenberg M. (1973). *Eur. J. Biochem.*, **34**, 358—365.
- LaNoue K. F., Schoolworth A. C. (1979). *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 871—922.
- Lee C.-P. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 105—114.
- Lundegårdh H. (1945). *Arch. Bot.*, **32A**, 12, 1.
- Meijer A. L., van Dam K. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 213—244.
- McCarty R. E. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 28—30.
- Mitchell P. (1961). *Nature (London)*, **191**, 423—427.

- Mitchell P. (1962). *Biochem. Soc. Symp.*, **22**, 142—168.
- Mitchell P. (1966). Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation, Glynn Research, Bodmin Cornwall, U. K.
- Mitchell P. (1968). Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction, Glynn Research, Bodmin, Cornwall, U. K.
- Mitchell P. (1974a). *FEBS Lett.*, **33**, 267—274.
- Mitchell P. (1974b). *FEBS Lett.*, **43**, 189—194.
- Mitchell P. (1975a). *FEBS Lett.*, **56**, 1—6.
- Mitchell P. (1975b). *FEBS Lett.*, **59**, 137—139.
- Mitchell P. (1976a). *J. Theoret. Biol.*, **62**, 327—367.
- Mitchell P. (1976b). *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 399—430.
- Mitchell P. (1977). *FEBS Lett.*, **78**, 1—20.
- Mitchell P. (1979a). *Eur. J. Biochem.*, **95**, 1—20.
- Mitchell P. (1979b). *Science*, **206**, 1148—1159.
- Mitchell P., Moyle J. (1958). *Proc. Roy. Soc., Edinburgh*, **27**, 61—72.
- Mitchell P., Moyle J. (1965). *Nature (London)*, **208**, 147—151.
- Mitchell P., Moyle J. (1967a). *Biochem. J.*, **105**, 1147—1162.
- Mitchell P., Moyle J. (1967b). *Biochem. J.*, **104**, 588—600.
- Mitchell P., Moyle J. (1968). *Eur. J. Biochem.*, **4**, 530—539.
- Mitchell P., Moyle J. (1969a). *Eur. J. Biochem.*, **7**, 471—484.
- Mitchell P., Moyle J. (1969b). *Eur. J. Biochem.*, **9**, 149—155.
- Mitchell P., Moyle J., Mitchell R. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 627—640.
- Moore A. L., Rich P. R. (1980). *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 284—288.
- Moyle J., Mitchell P. (1973). *FEBS Lett.*, **30**, 317—320.
- Moyle J., Mitchell P. (1978a). *FEBS Lett.*, **90**, 361—365.
- Moyle J., Mitchell P. (1978b). *FEBS Lett.*, **88**, 268—272.
- Munn E. A., (1974). *The Structure of Mitochondria*, Academic Press, London and New York.
- Nedergaard J., Cannon B. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 3—28.
- Nelson N. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 314—338.
- Neumann J., Jagendorf A. T. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 109—119.
- Nicholls D. G. (1974). *Eur. J. Biochem.*, **50**, 305—315.
- Nicholls D. G. (1976). *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 128—130.
- Nicholls D. G. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 1—29.
- Nicholls D. G., Bernson V. S. M. (1977). *Eur. J. Biochem.*, **75**, 601—612.
- Nicholls D. G., Crompton M. (1980). *FEBS Lett.*, **111**, 261—268.
- Okamoto H., Sone N., Hirata H., Yoshida M., Kagawa Y. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 6125—6131.
- Ovchinnikov Y. A. (1979). *FEBS Lett.*, **94**, 321—336.
- Palmer J. M. (1979). *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 246—252.
- Palmieri F., Klingenberg M. (1979). *Methods Enzymol.*, **56**, 279—301.
- Papa S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 39—84.
- Park R. B., Sane P. V. (1971). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 395—430.
- Parson W. W., Cogdell R. J. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 105—149.
- Pedersen P. L. (1975). *Bioenergetics*, **6**, 243—275.
- Penevsky H. S. (1979). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **49**, 223—280.
- Pressman B. C. (1976). *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 501—530.
- Prince R. C., Dutton P. L. (1978). In: *The Photosynthetic Bacteria* (R. K. Clayton and W. R. Sistrom, eds.), pp. 439—453, Plenum, New York.
- Puskin J. S., Gunter T. E., Gunter K. K., Russell P. R. (1976). *Biochemistry*, **13**, 4811—4817.
- Racker E. (1975). *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 785—802.
- Racker E. (1976). *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 244—247.
- Racker E. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 699—711.
- Racker E., Stoekenius W. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—663.
- Ragan C. I. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 249—290.
- Ragan C. I., Heron C. (1978). *Biochem. J.*, **174**, 783—790.
- Ramos S., Schuldiner S., Kaback H. R. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 680—688.
- Reeves S. G., Hall D. O. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 275—297.
- Reynafarje B., Brand M. D., Alexandre A., Lehninger A. L. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 640—656.
- Rieske J. S. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 179—193.
- Rieske J. S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 195—247.
- Rosing J., Slater E. C. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 275—290.
- Rottenberg H. (1975). *Bioenergetics*, **7**, 61—74.
- Rottenberg H. (1976). *FEBS Lett.*, **66**, 159—163.
- Rottenberg H. (1979a). *Methods Enzymol.*, **55**, 547—569.
- Rottenberg H. (1979b). *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 225—253.
- Rydström J. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 155—184.
- Ryrie I. J., Jagendorf A. T. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 4453—4459.
- Saris N.-E. L., Åkerman K. E. O. (1980). *Curr. Topics Bioenergetics*, **10**, 103—179.
- Scarpa A. (1980). *Methods Enzymol.*, **56**, 301—338.
- Scheurich P., Schäfer H.-J., Dose K. (1978). *Eur. J. Biochem.*, **88**, 253—257.
- Selwyn M. J., Dawson A. P., Dunnett S. J. (1970). *FEBS Lett.*, **10**, 1—5.
- Senior A. E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 249—277.
- Shavit N. (1980). *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 111—138.
- Singer S. J., Nicolson G. L. (1972). *Science*, **175**, 720—731.
- Skulachev V. P. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30—42.
- Skulachev V. P. (1971). *Curr. Topics Bioenergetics*, **4**, 127—190.
- Skulachev V. P. (1976). *FEBS Lett.*, **64**, 23—25.
- Skulachev V. P. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 586—603.
- Slater E. C. (1953). *Nature (London)*, **172**, 975—976.
- Slater E. C. (1974). *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1149—1163.
- Slater E. C., Rosing J., Mol A. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 534—553.
- Sone N., Yoshida M., Hirata H., Kagawa Y. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 2956—2960.
- Sorgato M. C., Ferguson S. J., Kell D. B., John P. (1978). *Biochem. J.*, **174**, 237—256.
- Stoekenius W. (1976). *Sci. Amer.*, **234**, 38—46.
- Stoekenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 215—278.
- Tedeschi H. (1979). *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N182—N185.
- Thayer W. S., Hinkle P. C. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 5395—5402.
- Thayer W. S., Hinkle P. C. (1975). *J. Biol. Chem.*, **250**, 5330—5335.
- Trebst A. (1976). *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 60—62.
- Unwin P. N. T., Henderson R. (1978). *J. Mol. Biol.*, **94**, 425—440.
- Van Dam K., Westerhoff H. V., Krab K., van der Meer R., Arents J. C. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 240—250.
- Vignais P. V. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 1—38.
- Von Jagow G., Schagger H., Engel W. D., Machleidt W., Machleidt I., Kolb H. J. (1978). *FEBS Lett.*, **91**, 121—125.
- Waggoner A. S. (1976). *J. Mem. Biol.*, **27**, 317—334.
- Walz D. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 279—354.
- West I. C., Mitchell P. (1972). *J. Bioenergetics*, **3**, 445—462.
- West I. C., Mitchell P. (1973). *Biochem. J.*, **132**, 587—592.
- Westerhoff H. V., van Dam K. (1979). *Curr. Topics Bioenergetics*, **9**, 1—62.
- Wikström M. K. F. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 155—193.
- Wikström M. K. F., Krab K. (1978). *FEBS Lett.*, **91**, 8—14.
- Wikström M. K. F., Krab K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 177—222.
- Wikström M. K. F., Krab K. (1980). *Curr. Topics Bioenergetics*, **10**, 51—101.
- Wilbrandt W. (1974). In: *Biomembranes* (H. Eisenberg et al., ed.), vol. 7, 11—31, Plenum, New York.
- Williams R. J. P. (1961). *J. Theor. Biol.*, **1**, 1—13.
- Williams R. J. P. (1976). *Trends Biochem. Sci.*, **1**, N222—N24.
- Williams R. J. P. (1978a). *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 1—44.

- Williams R. J. P. (1978b). FEBS Lett., 85, 9—19.
 Wilson D. B. (1978). Annu. Rev. Biochem., 47, 933—965.
 Witt H. T. (1979). Biochim. Biophys. Acta, 505, 365—427.
 Wraight C. A., Cogdell R. J., Chance B. (1978). In: The Photosynthetic Bacteria (R. K. Clayton and W. R. Sistrom, eds.), pp. 471—511, Plenum, New York.
 Zalman L. S., Nikaido H., Kagawa Y. (1980). J. Biol. Chem., 255, 1771—1774.
 Zilberstein D., Schuldiner S., Padan E. (1979). Biochemistry, 18, 669—673.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Ac	Ацетат
AcAc	Ацетоацетат
ADP/O	Число молекул ADP, фосфорилированных до АТФ при переносе двух электронов по дыхательной цепи от субстрата на кислород с образованием молекулы воды (безразмерная величина; разд. 4.6)
ADP/2e ⁻	Величина, аналогичная ADP/O, но учитывающая, что конечный акцептор электронов может отличаться от кислорода (безразмерная; разд. 4.6)
БХ	Бактериохлорофилл
БФ	Бактериофеофитин
CF _i	См. F _i
Ц-сторона	Сторона внутренней мембраны митохондрий, контактирующая с цитозолем (ср. М-сторона)
Хл	Хлорофилл
С _м H ⁺	Эффективная протонная проводимость мембраны или какого-то ее компонента (единица измерения: нмоль H ⁺ ·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹ ·мВ мембранного электрохимического потенциала протонов ⁻¹ ; разд. 4.5)
ДНФ	Динитрофенол (переносчик протонов)
ДЦКД	Дициклогексилкарбодимид (ингибитор АТФ-синтетазы; разд. 7.2)
dO/dt	Скорость дыхания (единица измерения: нмоль O ₂ ·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹)
E	Редокс-потенциал при рН=0 (единица измерения: мВ; разд. 3.3)
E ₀	Стандартный редокс-потенциал при рН=0 (единицы измерения: мВ; разд. 3.3)
E _h	Истинный редокс-потенциал при данном рН (единицы измерения: мВ; разд. 3.3)
E _m	Потенциал полувосстановления (стандартный редокс-потенциал при данном рН) (единицы измерения: мВ; разд. 3.3)
E _{h, 7}	Истинный редокс-потенциал при рН 7
E _{m, 7}	Потенциал полувосстановления при рН 7
ЭТЧ, СМЧ	Электронтранспортирующие частицы (субмитохондриальные частицы; разд. 1.3)
F	Число Фарадея (=0,0965 кДж·моль ⁻¹ ·мВ ⁻¹); коэффициент, на который следует умножить при переходе от мВ к кДж·моль ⁻¹ (разд. 3.3)

FCCP	Карбонилцианид- <i>n</i> - трифторметоксифенилгидразон, протонный переносчик
Fe/S-центр	Простетическая группа одного из классов редокс-белков, содержащих кислотолabile железо (разд. 5.2)
F ₀	Компонент АТР-синтетазы (разд. 7.3)
F ₁ CF ₁ TF ₁	Каталитический компонент АТР-синтетазы из митохондрий, хлоропластов и термофильной бактерии соответственно (разд. 7.3)
G	Свободная энергия (энергия Гиббса; разд. 3.2)
H	Энтальпия
H ⁺ /АТР	Число протонов, переносимых АТР-синтетазой, при синтезе одной молекулы АТР (безразмерная величина; разд. 4.4)
H ⁺ /O	Число протонов, переносимых дыхательной цепью, при прохождении 2e ⁻ от субстрата к кислороду (безразмерная величина; разд. 4.3)
hν	Энергия фотона (единица измерения: кДж; разд. 3.7)
J _{H⁺}	Протонный ток (единицы измерения: нмоль H ⁺ × мин ⁻¹ · мг белка ⁻¹ ; разд. 4.5)
K	Абсолютная константа равновесия (разд. 3.2)
K'	Кажущаяся константа равновесия (разд. 3.2)
kD	Килодальтон: 1000 единиц молекулярной массы
кДж	Килоджоуль
М-сторона	Сторона внутренней мембраны митохондрий, контактирующая с матриксом
N-ЭМ	N-этилмалеимид
O	$\frac{1}{2}$ O ₂
OSCP	Белок, сообщающий чувствительность к олигомицину (разд. 7.2)
PC	Пластоцианин (разд. 6.4)
ФЕП	Фосфоенолпируват
P _i	Ортофосфат
PMS	Феназинметосульфат
PQ	Пластохинон
P/O	Определяется так же, как ADP/O
P/2e ⁻	Определяется так же, как ADP/2e ⁻
PS _I , PS _{II}	Фотосистемы I и II в хлоропластах (реакционные центры; разд. 6.4)
P ₈₇₀ и т. п.	Первичный фотохимический компонент в реакционном центре (разд. 6.2)
q ⁺ /O	Число зарядов, переносимых через мембрану при

q ⁺ /2e ⁻	переносе 2e ⁻ от субстрата на кислород по дыхательной цепи (разд. 4.3) Величина, аналогичная q ⁺ /O, но учитывающая, что конечный акцептор электронов может отличаться от кислорода (разд. 4.3)
R	Универсальная газовая постоянная (=0,0083 кДж · моль ⁻¹ · К ⁻¹)
PC	Реакционный центр (разд. 6.1)
S	Энтропия
T	Абсолютная температура в градусах Кельвина (K)
TMPD	Тетраметил- <i>n</i> -фенилендиамин (редокс-медиатор; разд. 5.9)
TRMP ⁺	Катион триметилфенилфосфония (синтетический проникающий катион; разд. 2.5)
UQ, UQH, UQH ₂ , UQ ₂ , UQ ₈ , UQ ₁₀	Окисленная, семихинонная и восстановленная формы убахинона. Индексы указывают число изопреноидных остатков в боковой цепи
Г, Г'	Абсолютное и кажущееся соотношения действующих масс (разд. 3.2)
ΔE _h	Истинная разность редокс-потенциалов между двумя парами при данном pH (единицы измерения: мВ; разд. 3.3)
ΔE _{h,7}	То же, что и ΔE _h , но при pH=7 (разд. 3.3)
ΔG	Изменение свободной энергии (единицы измерения: кДж · моль ⁻¹ ; разд. 3.2)
ΔG ⁰	Стандартное изменение свободной энергии, рассчитанное на основании абсолютной константы равновесия (разд. 3.3)
ΔG ^{0'}	Стандартное изменение свободной энергии, рассчитанное на основании кажущейся константы равновесия при указанных значениях pH (разд. 3.3)
ΔG _P	«Фосфатный потенциал», т. е. изменение свободной энергии при синтезе АТР из ADP и P _i (разд. 3.3)
ΔH	Изменение энтальпии
ΔpH	Разность pH между водными фазами по разные стороны мембраны (безразмерная величина)
ΔS	Изменение энтропии
Δμ _{X^{m+}}	Разность электрохимических потенциалов иона X ^{m+} между водными фазами, разделенными мембраной (разд. 3.4)
Δμ _{H⁺}	Разность электрохимических потенциалов протонов между водными фазами, разделенными мембраной (единицы измерения: мВ; разд. 3.4); иногда ее называют также протондвижущей силой (пдс)

Δφ

Мембранный потенциал, т. е. разность электрических потенциалов между водными фазами, разделенными мембраной (единицы измерения: мВ; разд. 3.4)

Сокращенное обозначение гипотетического высокоэнергетического интермедиата в химической гипотезе сопряжения

Активный транспорт 34

9-Аминоакридин 75, 144

Аммонийное набухание 164

Антенна 131—133, 140

Антимицин А 96, 109, 120

Антипорт 33, 58

Арсеназо III 169

Arum maculatum 125

Аскорбат 108—110, 121—122

АТР, синтез 49—52, 154—157

— — — в искусственной мембране 98

— — — условиях искусственного электрохимического градиента протонов 97—98

АТР-синтаза 149—161

— векторная транслокация групп 22—25

— в хлоропластах 144

— *E. coli* 151

— конформационные изменения 155—157

— механизм действия 154—157

— перенос протонов 23, 26

— протонное электрохимическое сопряжение 10—13

— реконструкция 115—116

— связывание адениновых нуклеотидов 155—157

— стехиометрия H⁺/АТР 63, 85—86

— структура 149—152

— термодинамика катализируемой ею реакции 49—52

— термофильных бактерий 150—157

— функции 152—153

Атрактилат 88, 90

Atractylis gummifera 158

Ацетат, проницаемость для него митохондрий 40—43

Бактериородопсин 27, 145—147

Бактериофеофитин 133—135

Бактериохлорофилл 133—135

Белок *Риске* 119

Белок, сообщающий чувствительность к олигомицину (OSCP) 151

Бонгкрековая кислота 158—161

Бурый жир, митохондрии 43, 86, 91, 93

N-Бутилмалонат 88

Валиномицин 36—37, 42, 61, 71—72, 78—80, 123, 137, 138, 153

Векторный перенос групп 22—28, 81—84, 171—173

— — — в АТР-синтазе 24

— — — модели 22

Высокоэнергетический интермедиат см. Интермедиат, переносящий энергию

Галобактерин 145—147

Гексокиназная ловушка 94—95

Гидрогеназа 127—128

α-Глицерофосфат — дегидрогеназа 11, 117

α-Глицерофосфатный челночный механизм окисления NADH 167—168

Глутамат-аспартатный цикл 166—167

Грамицидин 27, 361—372

Грана 15

Дезоксихолат 115

Дитионит 87, 109, 119

Дифференциальный спектр 102—105

Диффузионный потенциал 61, 78

Дициклогексилкарбодимид 151—152

Доннановский потенциал 61

Дыхание 92—93

— протонная проводимость 92

Дыхательная цепь 100—129

— — бактерий 126—129

— — в митохондриях 100, 108—125

— — растений 125—126

— — *Rhodospseudomonas sphaeroides*

- 139—140
 — — *E. coli*
 — — комплексы 115—124
 — — фракционирование и реконструкция 115—116
 — — компоненты 100—108
 — — методы определения 100—108
 — — линейная последовательность редокс-переносчиков 108—113
 — — перенос протонов 23
 — — электронов 23—28, 83—84, 114—115, 121, 123—124, 126
 — — протонные помпы 69—70
 — — редокс-переносчики 101—103, 121—124
 Дыхательный контроль 89—93
 — — протонный электрохимический потенциал 89—92
E. coli, величины протонного электрохимического потенциала 75
 — дыхательная цепь 126—129
 Железосерные белки 103, 105—106, 117, 119, 127—129
 — — в пурпурных бактериях 138
 — — определение с помощью ЭПР 106
 — — структура 105
 Жидкостно-мозаичная модель структуры мембран 30—31
 Ионофоры 35—39
 — образующие каналы 35, 37
 — подвижные переносчики 35—39
 Интермедиат, переносящий энергию 19—28
 Кабакосомы 15
 Калий, перенос, индуцированный ионофорами 35—38, 42—43
 Кальций, транспорт в митохондриях 168—171
 — — — по механизму унипорта 43, 169—170
 — уравнения электрохимического потенциала 58
 Карбониллианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон (FCCP) 38, 40, 43, 74, 78, 82, 88—91, 93—95
 Каротиноиды, спектральный сдвиг 77, 136—143
 Кванты 62
 Кислородный электрод 86—93, 108—109
 — — определение АДР/О 94
 Комплекс I 83, 108, 116—118
 — II 117—118
 — III 111, 119—121
 — IV 121—124
 Комплексы I—IV 116—124
 — — стехиометрия $H^+/2e^-$ 83
 Компонент F_0 151—153
 Константа равновесия 47—52
 Конформационная теория 25
 Конформационные помпы 83—84, 113—115, 121—124
 Котранспорт см. Симпорт
 Коэнзим Q см. Убихинон
 Липидный бислой, образование 18—19
 — — проницаемость, индуцированная ионофорами 35—39
 — — — природная 35—39
 Липосомы 18—19
 Липофильные ионы 26, 39, 124—125, 142—143
 Малонат 88
 Медь в дыхательной цепи 103, 121—124
 Мембранный потенциал 57—62
 — — в хлоропластах 143—144
 — — измерение по распределению меченых соединений 73
 — — — с помощью ионселективных электродов 71—73
 — — — — липофильных ионов 71—73, 75
 — — — — спектральных индикаторов 76—78
 — — образование благодаря гидро-

- лизу АТР 78
 — — — — субстрату дыхания 78
 — — — — относительный вклад в $\Delta\mu_{H^+}$ 79—80
 Менахинон 107—108, 127—128
 Мерсалил 158
 Метилтрифенилфосфоний (TRMP) 39, 80
 Метод кислородных пульсов 81—84
 Митохондрии, буферная емкость матрикса 72, 80
 — величины протонного электрохимического потенциала 71—73, 75, 86, 91—92
 — выделение 14
 — объем матрикса 76
 — переносчики метаболитов 163—168
 — растений 126
 — строение 13—14
 Модель «петель» в дыхательной цепи 23—28, 83—84, 114—115, 121, 123—124, 126
 NAD^+ , восстановление 52, 100—101, 124—125
 — структура 101
 $NADH$, окисление в митохондриях 126, 166—168
 — структура 101
 — субстрат комплекса I 108, 117
 $NADH$ -дегидрогеназа 116—117, 127—128
 Негемовые железосодержащие белки см. Железосерные белки
 Нейтральный красный 144
 Неконтролируемое дыхание 92
 Нигерицин 37—38, 39, 42
 Обменная диффузия см. Антипорт
 Обменные переносчики см. Транспортные белки
 Обратный перенос электронов 95—97
 — — — в фотосинтезирующих бактериях 138—140
 Окислительно-восстановительный потенциал см. Редокс-потенциал
 Окись углерода 122
 Оксинолы 77
 Олигомицин 20, 79—80, 85, 88, 90, 95—96, 151—152
 Осмотическое набухание митохондрий 41—43, 79—80, 163—165
Paracoccus denitrificans 127
 Перенос водорода 52
 — протонов АТР-синтетазой 23, 25—28
 — — дыхательной цепью 25—26
 — — фотосинтетической электрон-переносящей цепью 25—28
 Переносчик карнитина 165—166
 — трикарбоксилатный 168
 — фосфата 157—161
 Переносчики метаболитов в митохондриях 166
 — протонов 38—39, 84—85, 90—91, 125
lac-Пермеаза 171—173
 Пируват, транспорт в митохондриях 40, 165—166
 Пластохинон 197—198, 142—144
 Пластоцианин 141
 Поверхностный потенциал 62
 Постоянная Планка 62
 Потенциал полувосстановления 54—55, 112, 118—121, 125
 — — в реакционных центрах 133—144
 — — — хлоропластах 140
 — — редокс-компонентов митохондрий 108—113
 Превращение энергии 20
 Протондвижущая сила см. Протонный электрохимический потенциал
 Протондвижущий Q-цикл см. Q-Цикл
 Протонная проводимость 26, 92—93
 Протонные переносчики 38—39
 Протонный градиент 57
 — ток 81, 86—93
 — цикл 25, 27, 68—69
 — — аналогия с электрической цепью 12, 68—70, 87—88
 — — в хлоропластах 143—144
 — электрохимический потенциал 10,

57, 58, 75
 — — — влияние ADP 90—91
 — — — — FCCP 91
 — — — генерация в пурпурных бактериях 136—140
 — — — зависимость от поверхностного потенциала 62
 — — — измерение 70—80
 — — — — по распределению меченых соединений 73—76, 86, 91
 — — — — с помощью ионселективных электродов 71—73
 — — — — относительный вклад $\Delta\psi$ и ΔpH 79—80, 98
 Проточный диализ 73—74
 Пурпурные мембраны 145—147
 Пьеридин А 117
 Равновесие реакции, определение 47—48
 Равновесные распределения ионов 29, 59—62
 Разность электрохимических потенциалов ионов 57—58
 Разобшители см. Переносчики протонов
 Реакционные центры 17, 131—143
 — — — организация в мембранах 137, 142
 — — — перенос электронов 134
 — — — структура 133—135
 Редокс-медиатор 54, 110
 Редокс-пара 53—57, 100
 Редокс-потенциал 47, 53—57, 63—64, 108—113
 — — — дыхательной цепи митохондрий 100—113
 Редокс-потенциометрия 109—113
 Реконструированные системы 18—19, 116
 Ретиналь 145—147
Rhodospseudomonas sphaeroides 134—140
 Ротенон 109, 117
 Рутениевый красный 169—170
 Сафранин 77—78
 Сахароза 76

Светорассеяние, набухание митохондрией 40—43, 163—165
 Свободная энергия 46—66
 Семихинон 121, 134—135, 142
 Симпорт 32—33
 Слабые кислоты 60—62, 80
 — — — равновесное распределение ионов 59—60
 — — — основания 60—62, 80
 — — — равновесное распределение ионов 59—60
 Соотношение ADP/O 89, 93—95
 — — — действующих масс 48—52
 — — — Р/О 94—95
 Сопрягающие мембраны 9—19
 — — — мембранный потенциал 61
 — — — напряженность электрического поля 34
 — — — структура 30—31
 Состояния дыхания 73
 Спектроскопия 101—105
 Спектрофотометр двухволновой 102—105
 — — — двухлучевой 102—105, 110—111
 Стандартный водородный электрод 53
 — — — редокс-потенциал 54—57
 Стехиометрия ADP/2e⁻ 85
 — — — H⁺/2e⁻ 63, 81—84, 95, 113—115, 122—124, 144
 — — — переноса зарядов 81—84, 121—124
 Субмитохондриальные частицы, величины протонного электрохимического потенциала 75
 — — — спектр цитохрома 104
 — — — стехиометрия H⁺/ATP 85, 95
 — — — строение 13—14
 Субстратное фосфорилирование 20—24
 Сукцинатдегидрогеназа 100—101, 117—118
 Сферопласты 14—15
 Термодинамика неравновесная 64—66
 — — — типы систем 45—46
 Термофильные бактерии PS3 150—157
 Тетраметил-л-фенилендиамин (TMPD)

108—109, 121—124
 Тетрафенилборат 39
 Тилакоид 15—16, 140—144
Thiobacillus ferrooxidans 129
 Тиоцианат; проницаемость мембраны 42—43
 Трансгидрогеназа никотинамиднуклеотидов 124—125
 Транслоказа адениновых нуклеотидов 90, 157—161
 — — — модель работы 159
 Транспорт в бактериях 171—173
 — — — ионов 27, 30—34
 — — — активный 34
 — — — катализируемый белками 40
 — — — классификация систем 32
 — — — через бислой 34
 — — — электронейтральный 32—33
 — — — электрофоретический 32—33
 — — — метаболитов 163—173
 — — — методы исследования 163—165
 — — — фосфата, влияние на стехиометрию H⁺/O 81—82
 Транспортные белки 27—28, 40
 Убихинон 103, 105—108, 118—121, 126
 — — — восстановление 52
 — — — роль в дыхательной цепи 107—108, 119—121
 — — — — реакционных центрах 134—144
 — — — структура 107
 Унипорт 32—33, 58
 Уравнение Нернста 59, 76
 F₀ 151—153
 FAD 100—101, 117—118, 128
 Феназинметосульфат 143
 Фенилдикарбаундекаборан 125
 Ферредоксин 105, 140—144
 Ферредоксин — NADP⁺-редуктаза 141—143
 Феррицианид 108, 111, 117, 120, 143
 Ферроцианид 123
 Флавинмонопонуклеотид (FMN) 100—101, 114, 117
 Флавопротеин 101

Формиатдегидрогеназа 128
 Фосфатный потенциал 52, 86
 Фосфотрансферазная система 173
 Фотоны 62—63
 Фотосинтез 131—143
 Фотосинтезирующие бактерии 17
 Фотосистема I 140—144
 — — — II 141—144
 FCCP 38, 40, 43, 74, 78, 82, 88—91, 93—95
 Хемисмотическая гипотеза 10—13, 19—28
 — — — экспериментальное подтверждение 25—28
 Хемолиотрофные бактерии 128
 Химическое сопряжение 20—28
 n-Хлормеркурибензоат 158
 Хлоропласты, величины протонного электрохимического потенциала 75
 — — — ингибиторы переноса электронов 141
 — — — нециклический перенос электронов 131, 140—144
 — — — получение 16
 — — — структура 15—16
 Хлорофилл 136, 140—145
 Холат, диализ 18—19, 115—116
 Хроматофоры 17, 133—140
 — — — величины протонного электрохимического потенциала 75
 Центрифугирование через силиконовое масло 74, 76, 165
 Цианид 88, 109, 121—124, 125
 Цианид-резистентная оксидаза 126
 Цианиновые красители 77
 Цианогидроксидиннамат 165—166
 Q-Цикл 107, 113, 118—121
 Циклический перенос электронов 131, 136—140
 Циклическое фосфорилирование 143
 Цитохром a 103
 — — — — — разделение в присутствии CO 105
 — — — a₃ 104—105

Цитохром <i>b</i> 103, 112, 118—121, 126—129, 134—140	Электрический транспорт 32
— — в комплексе II 118	Электронейтральный транспорт 32—33, 80
— <i>b_K</i> 105, 119—121	Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 105—107, 121
— <i>b_T</i> 105, 119—121	Электронпереносная цепь <i>см.</i> Дыхательная цепь
— <i>b₅₅₆</i> 127	Электронпереносный флавопротеин 101, 117
— <i>c</i> 52, 103—105	Электронтранспортные частицы <i>см.</i> Субмитохондриальные частицы
— — комплекс IV 121	Электрофоретический транспорт 32—33
— — спектр 104	Электрохромизм 76—77, 136—143
— <i>c</i> ₁ 105, 119—121	Энергия Гиббса <i>см.</i> Свободная энергия
— <i>c</i> ₂ 134—135	Энтальпия 46
— <i>d</i> 103, 127—128	Энтропия 46
— <i>f</i> 141	N-Этилмаленимид 81, 84, 155, 158
— <i>o</i> 103, 126—128	
Цитохром <i>c</i> -оксидаза 121	
Цитохромы 103—105	
— спектры 103—104	
— — при температуре жидкого азота 104	
Эксперимент с «кислотной ванной» 97—98	

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	7
Глава 1. Хемиосмотический принцип энергетического сопряжения	9
1.1. Что такое энергетическое сопряжение?	9
1.2. Хемиосмотическая гипотеза	10
1.3. Сопрягающие органеллы	13
1.4. Предпосылки хемиосмотической гипотезы	19
Глава 2. Транспорт ионов через сопрягающие мембраны	30
2.1. Введение	30
2.2. Структура сопрягающих мембран	30
2.3. Пути ионного транспорта	31
2.4. Природная проницаемость бислойных участков мембраны	34
2.5. Индуцированная ионофорами ионная проницаемость бислойных участков мембран	35
2.6. Транспорт, катализируемый белками	40
2.7. Движение веществ через сопрягающие мембраны	40
Глава 3. Количественная биоэнергетика: измерение движущих сил	45
3.1. Введение	45
3.2. Свободная энергия	47
3.3. Окислительно-восстановительные (редокс) потенциалы	52
3.4. Разность электрохимических потенциалов ионов	57
3.5. Равновесные распределения ионов; слабые кислоты и слабые основания	59
3.6. Мембранный, диффузионный, доннаноуский и поверхностный потенциалы	61
3.7. Фотоны	62
3.8. Превращения энергии в биоэнергетике	63
3.9. Приложения неравновесной термодинамики	64
Глава 4. Хемиосмотический протонный цикл	68
4.1. Введение	68
4.2. Измерение электрохимического потенциала протонов	70
4.3. Стехиометрия переноса протонов в дыхательной цепи	81
4.4. Стехиометрия переноса протонов в АТР-синтетазе	84
4.5. Протонный ток, протонная проводимость и дыхательный контроль	86
4.6. Нехемиосмотические параметры энергетического сопряжения	93
4.7. Обратный перенос электронов и протонный цикл при гидролизе АТР	95
4.8. Синтез АТР в условиях искусственного электрохимического градиента протонов	97
Глава 5. Дыхательные цепи	100
5.1. Введение	100
5.2. Компоненты дыхательной цепи митохондрий и методы их определения	100
5.3. Линейная последовательность редокс-переносчиков в дыхательной цепи	108
5.4. Транслокация протонов в дыхательной цепи; структурные предсказания, вытекающие из модели «петель» и модели «конформационных помп»	113

5.5.	Фракционирование и реконструкция комплексов дыхательной цепи	115
5.6.	Комплекс I [NADH-дегидрогеназа (хинон)]	116
5.7.	Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа): электронпереносный флавопротени и α -глицерофосфатдегидрогеназа	117
5.8.	Убихинон и комплекс III (bc_1 -комплекс или UQ-цитохром c -оксидоредуктаза)	118
5.9.	Цитохром c и комплекс IV (цитохром c -оксидаза, ферроцитохром c : O_2 -оксидоредуктаза)	121
5.10.	Трансгидрогеназа никотинамиднуклеотидов	124
5.11.	Дыхательная цепь в митохондриях растений	125
5.12.	Дыхательные цепи бактерий	126
Глава 6.	Фотосинтетические генераторы протонного электрохимического потенциала	131
6.1.	Введение	131
6.2.	Световые реакции в пурпурных бактериях	133
6.3.	Генерация $\Delta\mu_{H^+}$ в пурпурных бактериях	136
6.4.	Путь переноса электронов в хлоропластах	140
6.5.	Протонный цикл в хлоропластах	143
6.6.	Бактериородопсин и пурпурные мембраны галобактерий	145
Глава 7.	АТФ-синтетаза	149
7.1.	Введение	149
7.2.	Структура АТФ-синтетазы	149
7.3.	Функционирование F_0	152
7.4.	Механизм синтеза АТФ	154
7.5.	Транспорт адениновых нуклеотидов и P_i в митохондриях	157
Глава 8.	Взаимоотношения между биоэнергетическими органеллами и окружающей их средой	163
8.1.	Введение	163
8.2.	Методы исследования транспорта метаболитов	163
8.3.	Переносчики метаболитов в митохондриях	165
8.4.	Транспорт кальция в митохондриях	168
8.5.	Транспорт в бактериях	171
Литература		174
Список принятых сокращений		179
Предметный указатель		183